

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**Especificidad funcional de los factores de
cohesión Pds5A y Pds5B**

María Carretero Ramírez

Directora: Dra. Ana Losada Valiente

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, Septiembre 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**Especificidad funcional de los factores de
cohesión Pds5A y Pds5B**

MARÍA CARRETERO RAMÍREZ

Licenciada en Biología

Directora: Dra. Ana Losada Valiente

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, Septiembre 2012

Memoria presentada por María Carretero Ramírez, licenciada en Biología para optar al grado de Doctora en Biología Molecular.

Este trabajo se ha realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección de la Dra. Ana Losada.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Ana Losada, mi directora de tesis por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo y su ayuda en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, por la excelente compañía y discusión científica.

Y a mi familia y amigos por el apoyo y estos años.

Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE

SUMMARY.....	1
--------------	---

ABREVIATURAS	5
--------------------	---

INTRODUCCIÓN	11
--------------------	----

1. El complejo Cohesina: composición y funcionamiento.....	13
1.1 Estructura del anillo de Cohesina	13
1.2 Modelos de funcionamiento de la Cohesina	15
2.1 Carga de la Cohesina en cromatina en G1	16
2.2 Establecimiento de la cohesión durante fase S	18
2.3 Mantenimiento de la cohesión en G2	19
2.4 Disolución de la cohesión en mitosis	20
3. Funciones de la Cohesina que implican cohesión	22
3.1 Importancia de la cohesión en la segregación cromosómica	22
3.2 Papel de la Cohesina en reparación de daño al ADN.....	24
4. Funciones de la Cohesina en interfase independientes de la cohesión	25
5. Cohesinas y enfermedad.....	26
5.1 Cohesinopatías	26
5.2 Cohesinas y cáncer	28
6. Las proteínas Pds5	28

OBJETIVOS.....	35
----------------	----

RESULTADOS	39
------------------	----

1. Caracterización de las proteínas Pds5.....	39
1.1 Comportamiento a lo largo del ciclo celular	39
2. Modelos de ratón deficientes en Pds5A y Pds5B	41
2.1 Generación de modelos de ratón deficientes para Pds5A y Pds5B	41
2.2. Pds5A y Pds5B son necesarias para completar el desarrollo embrionario.....	43
3. Efecto de la falta de función de Pds5 en la progresión del ciclo celular	46
3.1 Capacidad proliferativa	46
3.2 Progresión a través de la fase S.....	47
4. La falta de Pds5 aumenta la cantidad de Cohesina en la cromatina interfásica pero no afecta a la disociación en profase	48
5. Comportamiento de los factores de cohesión Wapl y Sororina en ausencia de Pds5	52
6. Pds5A y Pds5B tienen funciones no redundantes en el mantenimiento de la cohesión en distintas regiones cromosómicas.....	55
6.1 Pds5A tiene un papel predominante en la cohesión de telómeros y brazos cromosómicos	55
6.2 Pds5B es crítico para la cohesión centromérica.....	57
6.3 La Cohesina centromérica no es cohesiva si no está Pds5B.....	60
7. Consecuencias de la falta de Pds5B en segregación cromosómica.....	63

7.1 Defectos de segregación cromosómica y aneuploidía en ausencia de Pds5B	63
7.2 Las células sin Pds5B tienen problemas para biorientar los cromosomas.	66
7.3 Haspin y Aurora B no se localizan de forma adecuada en ausencia de Pds5B	69
DISCUSIÓN	75
1. Letalidad embrionaria tardía con características diferentes en ausencia de Pds5A o Pds5B.	75
2. Pds5 como regulador de la estabilidad de la asociación de Cohesina a cromatina	77
3. Especificidad de Pds5A y Pds5B en la cohesión en distintas regiones cromosómicas.....	78
4. La función de Pds5B es esencial para establecer y mantener la cohesión centromérica.	80
5. Segregación cromosómica y aneuploidía en ausencia de Pds5B.....	84
6. Las consecuencias de la aneuploidía para el organismo	87
7. Últimos comentarios.....	88
CONCLUSIONES	93
MATERIALES Y MÉTODOS	97
1. Ratones modificados genéticamente.....	97
1.1 Generación de los modelos animales.....	97
1.2 Genotipado	97
1.3 Histología	98
2. Cultivos y ensayos celulares	98
2.1 Extracción y cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).....	98
2.2 Inmortalización de MEFs.....	99
2.3 Curvas de proliferación	99
2.4 Citometría	99
2.5 Análisis de la incorporación de BrdU.....	99
2.6 siARN en MEFs.....	99
2.7 Hibridación in situ (FISH).....	100
2.8 Preparación de esparcidos de cromosomas metafásicos	100
2.9 Preparación y tinción de cromosomas metafásicos mediante Cytospin.....	101
2.10 Examen de las uniones MT-cinetocoro	101
2.11 Inmunofluorescencia.....	101
2.12 Microscopía y análisis de imagen	102
2.13 Videomicroscopía.....	102
3. Ensayos bioquímicos	102
3.1 Fraccionamiento celular	102
3.2 Western blot	103
3.3 Inmunoprecipitación	103
3.4 Cuantificación de mARNs de Pds5A y Pds5B en células y tejidos murinos.	103
BIBLIOGRAFÍA.....	107

SUMMARY

SUMMARY

Chromosome segregation is a crucial event in cell proliferation. One of the mechanisms that ensures its accuracy is sister chromatid cohesion mediated by cohesin. This multiprotein complex, conserved from yeast to human, is composed of four subunits: SMC1, SMC3, Scc1 (or Mcd1/Rad21) and Scc3 (or SA). Cohesin acts by entrapping the sister chromatids within its ring-shaped structure. A number of factors modulate the interaction of cohesin with chromatin throughout the cell cycle. Some of them interact transiently with the complex to promote its binding to chromatin in G1 phase, the establishment of cohesion upon ADN replication in S phase or the dissociation of cohesin from chromatin in mitosis. Others, like Pds5, Wapl and Sororin, are more stably bound to cohesin and modulate its dynamic association with chromatin. In particular, Pds5 is essential for the stable association of cohesin with chromatin in yeast whereas in higher eukaryotes Pds5 is also required for proper unloading of cohesin during mitotic prophase. In vertebrates there are two homologs of Pds5, Pds5A and Pds5B, but their specific functions are unclear. We have generated the conditional knockout mice for both Pds5A and Pds5B to address their specific role in cohesion and the significance of their functions in the context of an organism.

Complete ablation of either Pds5 protein results in embryonic lethality while heterozygous mice have no phenotype. We found that Pds5B is specifically required for centromeric cohesion, with Pds5A being more relevant for arm and telomere cohesion. Elimination of either Pds5 protein decreases Smc3 acetylation, a crucial step in cohesion establishment. In particular, we found that Pds5B is necessary for the accumulation of cohesin acetyl transferase Esco2 at the late replicating centromeric heterochromatin and this, in turn, prevents recruitment of Sororin to this region. As a consequence, centromeric cohesion is not established properly. Pds5B null cells can nevertheless progress through mitosis and align their chromosomes, showing no significant delay in prometaphase. However, chromosome biorientation and segregation is faulty and often leads to aneuploidy that can be observed both in cultured fibroblast and in fetal liver cells. None of these chromosome segregation defects are found in Pds5A null cells.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACA: Anti-centromere antibody

Ac Smc3: Acetil Smc3.

ADN: Ácido Desoxiribonucleico.

APC/C: *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome.*

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero

ARNi: ARN interferente.

BAC: *Bacterial Artificial Chromosome*

BrdU: *5-bromo-2'-deoxyuridine.*

BSA: *Bovine Serum Albumine.*

Cdk: Ciclina dependiente de quinasa

ChIP: *Chromatin Immunoprecipitation.*

CPC: *Chromosomal Passenger Complex.*

CTCF: *CCCTC binding factor.*

DAPI: *4,6-Diamidino-2-Phenylindole.*

DNMT: *ADN-Methyl-Transferase.*

DPC: *Days Post Coitum*

DSB: *Double Strand Breaks*

ESC: *Embryonic Stem Cell*

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting.*

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*

FITC: *fluorescein isothiocyanato.*

H-E: Hematoxilina-Eosina

H2BpT121: Histona H2B fosforilada en la treonina 121.

H3K93Me: Histona H3 trimetilada en la lisina 9.

H3pT3: Histona H3 fosforilada en la treonina 3.

H3S10P: Histona H3 fosforilada en la serina 10.

HP1: *Heterochromatin Protein 1.*

INCENP: *Inner Centromere Protein.*

Kb: Kilobase.

KDa: Kilo Dalton.

KO: *Knock-out.*

MEF: *Mouse Embryonic Fibroblast.*

MMC: Mitotic Checkpoint complex

MT: Microtúbulo

KT: *Kinetochores, Cinetocóro*

NDS: *Normal Donkey Serum.*

PB: Pares de bases

PBS: *Phosphatase Buffer Saline.*

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PCR: *Polymerase Chain Reaction.*

Pds5: *Precocious Dissociation of Sister chromatids 5.*

PFA: Paraformaldehído.

PNA: *Peptide Nucleic Acid.*

PSSC: *Premature Separation of Sister Chromatids.*

qPCR: PCR cuantitativa

Rb IgG: *Rabbit Immunoglobulin G.*

SA: *Stromal Antigen.*

SAC: *Spindle Assembly Checkpoint*

Scc: *Sister Chromatid Cohesion.*

Sgo: *Shugoshin* (espíritu guardián en japonés).

siRNA-siARN: *Small Interference RNA.*

SMC: *Structural Maintenance of Chromosomes.*

TBS: *Tris Buffered Saline.*

U.A.: Unidades Arbitrarias

WAPL: *Wings apart like.*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El material genético que contiene la célula debe transmitirse de forma fidedigna de generación en generación. Así, durante la mitosis, se generan dos células idénticas a la original. Para que esto ocurra, la célula duplica previamente la información genética en la “fase S” o de síntesis. Las dos copias equivalentes que constituyen el cromosoma replicado se denominan cromátidas hermanas, y la célula ha de asegurar que se mantengan unidas hasta el momento de su repartición entre las dos células hijas. Existen dos mecanismos que aseguran que así sea. Por un lado, durante la replicación del ADN se generan uniones de ADN entre las dos cromátidas como consecuencia del carácter semiconservativo de dicho proceso, denominadas catenaciones (Sundin and Varshavsky, 1980). Si bien muchas de estas catenaciones son eliminadas por las topoisomerasas de forma casi inmediata, un número indeterminado de las mismas permanece hasta el momento de la segregación cromosómica y contribuye de forma decisiva a la cohesión (Shamu and Murray, 1992, Farcas et al., 2011). Por otro lado, un complejo proteico llamado Cohesina, que se describirá en detalle a continuación, actúa como pegamento molecular entre las dos cromátidas (Guacci et al., 1997, Michaelis et al., 1997 Losada, 1998 #404). El trabajo que se describe en esta memoria se centra en el estudio de las proteínas Pds5, factores de cohesión que modulan la asociación de la Cohesina con la cromatina.

La función de Cohesina y los factores que la regulan es esencial tanto en mitosis como en meiosis. Aquí nos centraremos en células que se dividen mitóticamente. La mitosis conlleva cambios estructurales importantes en la célula y en base a ellos podemos dividir el proceso en varias fases (Figura 1). Al inicio de mitosis, en **profase**, la membrana nuclear se rompe y los microtúbulos invaden el espacio nuclear. La nucleación de los microtúbulos ocurre principalmente a partir de centrosomas situados uno enfrente del otro. Alrededor de cada centrosoma se dispone radialmente un conjunto de microtúbulos formando un áster, y posteriormente se establecen conexiones con los cromosomas (Tanenbaum and Medema, 2010). Los cromosomas experimentan un gran cambio morfológico que consiste, sobre todo, en la compactación de la cromatina (o condensación) y en la reorganización de la cohesión (o resolución). El resultado es un cromosoma visible como entidad individual bajo el microscopio, en el que se distinguen las dos cromátidas hermanas (Shintomi and Hirano, 2010). Además, cada cromátida ensambla sobre la región del centrómero una estructura proteica, denominada cinetocoro, encargada de interactuar con los microtúbulos para llevar a cabo el movimiento cromosómico (Santaguida and Musacchio, 2009).

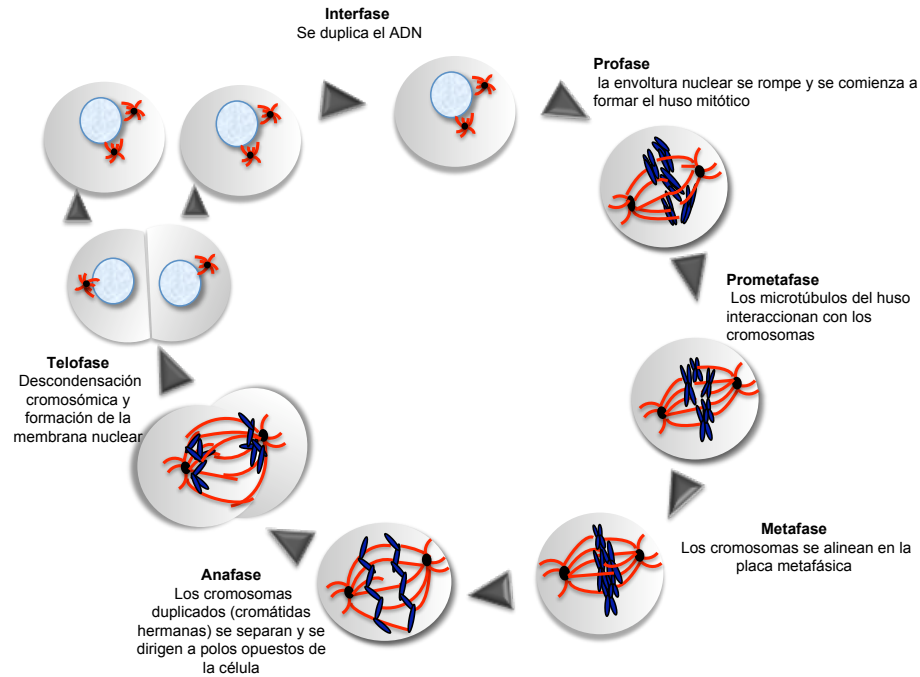


Figura 1. Diagrama del proceso de mitosis en una célula. Se muestran los cambios representativos que ocurren en la célula en cada una de las fases que se describen en el texto. Los cromosomas aparecen en azul y los microtúbulos del huso, en rojo. Los círculos negros representan a los centrosomas.

Durante la **prometafase** se completa la formación del huso bipolar y los cromosomas se mueven empujados por los microtúbulos hasta conseguir colocarse en el ecuador de la célula, lo que marca la entrada en **metafase**. En este momento los cromosomas están bajo tensión: por una lado, los microtúbulos anclados en los cinetocoros tiran de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos del huso; por otro, la cohesión entre las cromátidas hermanas impide su separación. Esta situación se conoce como biorentación (Kops, 2009). Una vez que la célula se asegura de que todos los cromosomas están biorientados se pone en marcha la **anafase**, regida por una cascada de señalización en la que la proteólisis juega un papel esencial (Oliveira and Nasmyth, 2010). El resultado es la disolución de la cohesión entre las cromátidas hermanas, de modo que éstas se mueven hacia polos opuestos de la célula. Se produce también la separación de los centrosomas y la segregación de los dos juegos idénticos de material genético, cada uno alrededor de un centrosoma. A continuación, en **telofase**, se produce la descondensación cromosómica, la formación de la membrana nuclear alrededor de ambos grupos cromosómicos y la división del citoplasma (citocinesis) dan lugar a la formación de dos células hijas (Steigemann and Gerlich, 2009). La progresión y ejecución de la mitosis está regulada por numerosas quinasas entre las que destacan la quinasa dependiente de Ciclina 1 (Cdk1), Polo y Aurora. La actividad de Cdk1, que requiere su asociación con Ciclina A o Ciclina B, es esencial para que se produzca la entrada en mitosis

(Draetta et al., 1989) en tanto que su inactivación por destrucción de la Ciclina B rige la salida de mitosis (Clute and Pines, 1999).

Entender los mecanismos que aseguran la correcta segregación cromosómica durante mitosis es importante desde el punto de vista del conocimiento básico, pero también en el terreno de la biomedicina. Los fallos en este proceso pueden generar células aneuploides, esto es, con un número incorrecto de cromosomas. La aneuploidía es causa de numerosas enfermedades congénitas y parece tener también un papel importante en el proceso de tumorigénesis (Rajagopalan and Lengauer, 2004, Weaver and Cleveland, 2006, Ganem et al., 2007). Por otro lado, la célula cancerígena es, ante todo, una célula en división. La mitosis es probablemente el momento del ciclo celular en que la célula es más vulnerable (Manchado et al., 2010). De hecho, varias clases de agentes antineoplásicos de uso clínico (taxol, vinca-alcaloides, etopósido) parecen actuar inhibiendo la progresión mitótica (Perez de Castro et al., 2007). Un conocimiento detallado de los mecanismos que rigen la división celular puede no sólo ayudarnos a entender el modo de acción de estas drogas y mejorar así la especificidad de los tratamientos, sino también proporcionar dianas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

1. El complejo Cohesina: composición y funcionamiento

1.1 Estructura del anillo de Cohesina

La Cohesina es un complejo formado por cuatro proteínas: Smc1, Smc3, Rad21 (o Scc1) y SA (o Scc3) [Ver Tabla 1 para nomenclatura del complejo en distintos organismos]. Las proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) son una familia de ATPasas muy conservadas a lo largo de la evolución, presentes desde bacterias hasta humanos. En organismos eucariotas se han descrito seis proteínas SMC (Losada and Hirano, 2005). Estas proteínas aparecen como heterodímeros que se asocian con subunidades adicionales para formar tres complejos diferentes que participan en aspectos fundamentales de la biología del cromosoma: Smc1 y Smc3 forman parte del complejo Cohesina, como se acaba de mencionar (Nasmyth and Haering, 2009); Smc2 y Smc4 se encuentran en el complejo Condensina, que juega un papel esencial en la condensación cromosómica (Shintomi and Hirano, 2011); Smc5 y Smc6, cuyas secuencias son sustancialmente divergentes a las de las Smc1-4, aparecen en un complejo implicado en reparación y en procesos relacionados con la topología del ADN (Bermudez-Lopez et al., 2010, Kegel et al., 2011)

Las proteínas SMC son polipéptidos de aproximadamente 150 kDa con dos dominios globulares en los extremos amino y carboxilo-terminales desde los que se extienden sendas

regiones *coiled-coil* separadas por un dominio bisagra (*hinge*). Estas moléculas se pliegan por el dominio bisagra, plegamiento que se estabiliza por interacciones entre las regiones *coiled-coil*, creando una molécula con un dominio con actividad ATPasa en un extremo y el dominio bisagra en el otro (Hirano, 2006). Dos proteínas SMC interaccionan a través de los dominios bisagra produciendo un dímero en forma de “V” (Figura 2A). Experimentos bioquímicos realizados en levaduras sugieren que la subunidad Rad21 de la Cohesina se une a las regiones aminoterminal y carboxiloterminal de Smc3 y Smc1, respectivamente. Se formaría así una estructura en forma de anillo de aproximadamente 50 nm de diámetro que en principio podría rodear una fibra de ADN de 10 nm de diámetro (Haering et al., 2002, Haering et al., 2004). Las imágenes de microscopía electrónica de Cohesina purificada de células humanas confirman la existencia de esta peculiar estructura en forma de anillo (Anderson et al., 2002)(Figure 2B).

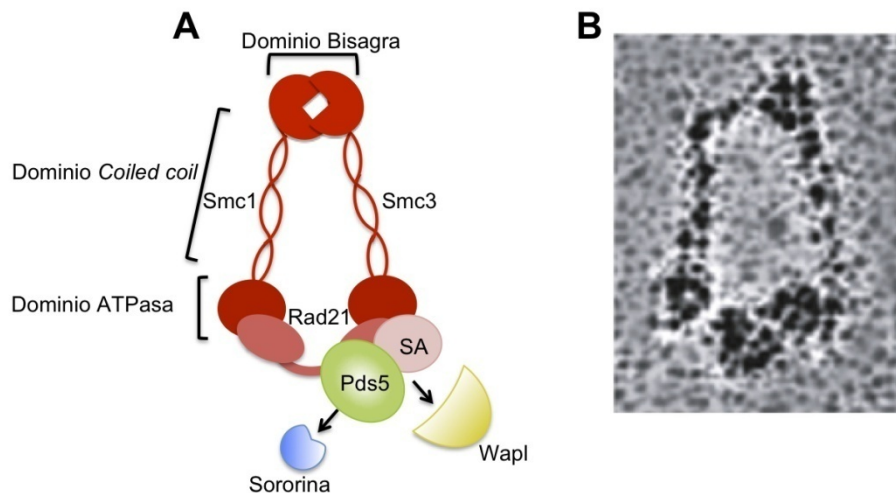


Figura 2. Estructura del anillo de Cohesina. A. Representación esquemática de la estructura de la Cohesina que muestra la posición relativa de sus subunidades. Se indican los dominios de las proteínas SMC. Se incluyen también las proteínas asociadas al complejo encargadas de regular su función: Wapl, Pds5 y Sororina. La interacción de Wapl con Cohesina depende de Rad21, SA, y Pds5. En el caso de Sororina la interacción ocurre exclusivamente a través de Pds5. B. Micrografía electrónica de un complejo Cohesina purificado de células humanas (Anderson et al., 2002).

La cuarta subunidad del complejo es SA (*Stromal Antigen*). En células somáticas de vertebrados se han identificado dos variantes de la subunidad SA, SA1 y SA2, y se ha descrito también una subunidad SA3 que es específica de la línea germinal (Losada et al., 2000, Sumara et al., 2000, Prieto et al., 2001). Estas dos variantes de SA no coexisten nunca en un mismo anillo de Cohesina, de modo que existen dos versiones del complejo dependiendo de qué SA lleven unida. Estudios recientes en células humanas y de ratón apuntan a que Cohesina-SA1 y Cohesina-SA2 serían responsables de la cohesión telomérica y centromérica, respectivamente (Canudas and Smith, 2009, Remeseiro et al., 2012a).

La asociación de Cohesina con la cromatina a lo largo del ciclo celular está modulada por su interacción con varias proteínas, a veces consideradas subunidades del propio complejo. Nos referimos a Pds5, Wapl y Sororina (Figura 2A). Todas ellas se unen a cromatina de forma dependiente de Cohesina. Pds5 y Wapl son proteínas grandes (140-160 kDa y 180 kDa, respectivamente), conservadas en la evolución (Losada et al., 2005, Gandhi et al., 2006, Kueng et al., 2006). Sororina, de 35 kDa, se ha identificado hasta el momento sólo en metazoos (Nishiyama et al., 2010). Pds5 contiene repeticiones tipo HEAT, que también se encuentran en la subunidad SA (Panizza et al., 2000, Neuwald and Hirano, 2000). Wapl posee tres dominios “FGF” situados en su extremo amino terminal, el primero de ellos implicado en la interacción con Rad21-SA y los otros dos en la interacción con Pds5 (Shintomi and Hirano, 2009). Wapl y Sororina parecen competir por la unión a Pds5 (Nishiyama et al., 2010). Como se describe en los apartados siguientes, estas dos uniones tendrían efectos opuestos: en tanto que Wapl-Pds5 desestabiliza la asociación de Cohesina a la cromatina, Sororina-Pds5 la estabiliza y permite el establecimiento de la cohesión (Nasmyth, 2011).

Papel	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Vertebrados
Subunidades del complejo Cohesina	Smc1 Smc3 Scc1/Mcd1 Scc3/Irr1	Psm1 Psm3 Rad21 Psc3	Smc1 Smc3 Rad21 SA1	Smc1 Smc3 Rad21 SA1 y SA2
Factores reguladores	Pds5 Rad61/Wpl1 -	Psd5 Wpl1 -	Pds5 Wapl Dalmatian	Pds5A y Pds5B Wapl Sororina
Carga de Cohesina	Scc2 Scc4	Mis4 Ssl3	Nipped-B Mau-2	NIPBL Scc4/Mau-2
Establecimiento de la cohesión	Eco1/Ctf7	Eso1	Deco y San	Esco1 y Esco2

Tabla 1. Nomenclatura de las subunidades del complejo Cohesina y los factores que interaccionan con él en distintos organismos.

1.2 Modelos de funcionamiento de la Cohesina

Existen varios modelos para explicar cómo funciona la Cohesina. El primero y más aceptado propone que un solo anillo Smc1-Rad21-Smc3 abraza a las dos cromátidas hermanas (Figura 3A) (Haering et al., 2002). Las siguientes evidencias experimentales apoyan este modelo “topológico”:

- La proteólisis tanto de Rad21 como de Smc3 destruye la integridad del anillo y provoca la disociación de la Cohesina de cromatina (Gruber et al., 2003, Uhlmann et al., 1999).

- La linearización de un minicromosoma circular con enzimas de restricción provoca igualmente la disociación de la Cohesina sin ser necesaria la proteólisis de ninguna de sus subunidades (Ivanov and Nasmyth, 2005).

- La fusión de Smc1 y Smc3 a través de sus dominios bisagra impide la unión de la Cohesina a la cromatina, lo cual está de acuerdo con la idea de que el anillo tiene que abrirse para poder asociarse a la cromatina (Gruber et al., 2006).

- Si una vez que la Cohesina se ha cargado en cromatina se estabiliza la interacción entre sus subunidades mediante entrecruzamiento *in vitro*, esta no puede disociarse de la cromatina ni siquiera en condiciones desnaturalizantes (Haering et al., 2008).

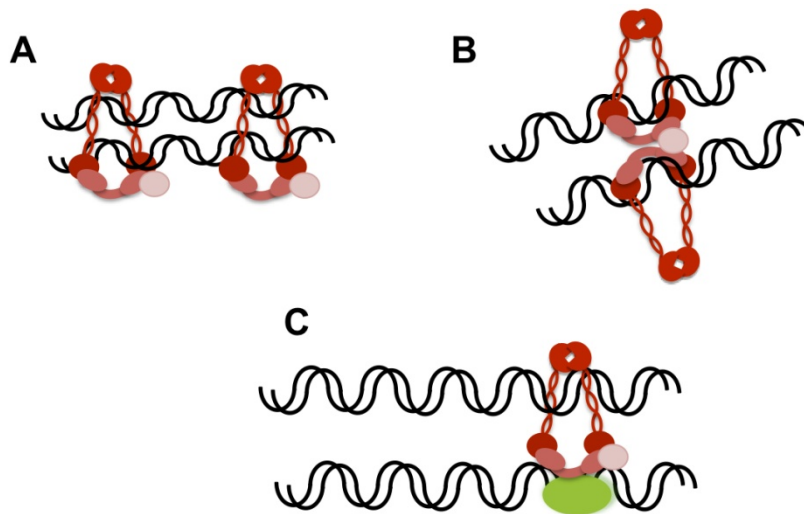


Figura 3. Modelos de funcionamiento de la Cohesina. A. Modelo de anillo. B. Modelo de esposas. C. Las Cohesina interacciona con factores de silenciamiento en locus MAT (en verde).

Un modelo alternativo de funcionamiento de la Cohesina, denominado de esposas (*handcuff*), propone que un anillo de Smc1-Rad21-Smc3 abraza cada cromátida y ambos comparten una misma molécula de SA (Zhang et al., 2008b). También es posible que la Cohesina sea capaz de funcionar de diferentes maneras en diferentes regiones. Así, en el locus MAT de levaduras se ha observado que un anillo de Cohesina que abraza una única cromátida interacciona con factores de silenciamiento presentes en la cromátida hermana para establecer la cohesión en esta región (Figura 3C)(Chang et al., 2005)

2. Regulación de la cohesión a lo largo del ciclo celular

2.1 Carga de la Cohesina en cromatina en G1

La asociación de Cohesina a cromatina está cuidadosamente regulada a lo largo del ciclo celular (Figura 4). La carga de Cohesinas en cromatina se inicia al final de G1 en levaduras y al comienzo de esta misma fase en otros eucariotas y está mediada en todos los

casos por un heterodímero formado por Scc2 y Scc4 (Nipbl-Mau2 en vertebrados) (Bernard et al., 2006, Seitan et al., 2006, Toth et al., 1999, Watrin et al., 2006, Furuya et al., 1998, Rollins et al., 1999). Se desconoce el mecanismo molecular por el que Scc2-Scc4 facilita la unión de la Cohesina a la cromatina, si bien se ha propuesto que el heterodímero podría promover la hidrólisis de ATP por Smc1 y Smc3 y esto estimularía la apertura del anillo (Arumugam et al., 2003, Weitzer et al., 2003). Dicha apertura podría tener lugar mediante la separación de los dominios bisagras (Gruber et al., 2006, Milutinovich et al., 2007). En extractos de *Xenopus laevis* la carga de Cohesina requiere la presencia en cromatina de complejos pre-replicativos (pre-RC) que reclutan a Scc2-Scc4 a través de la quinasa Cdc7 (Gillespie and Hirano, 2004, Takahashi et al., 2008). Este requerimiento no se ha descrito en levaduras ni en células humanas por lo que puede que sea específico de estadios embrionarios (Uhlmann and Nasmyth, 1998, Guillou et al., 2010).

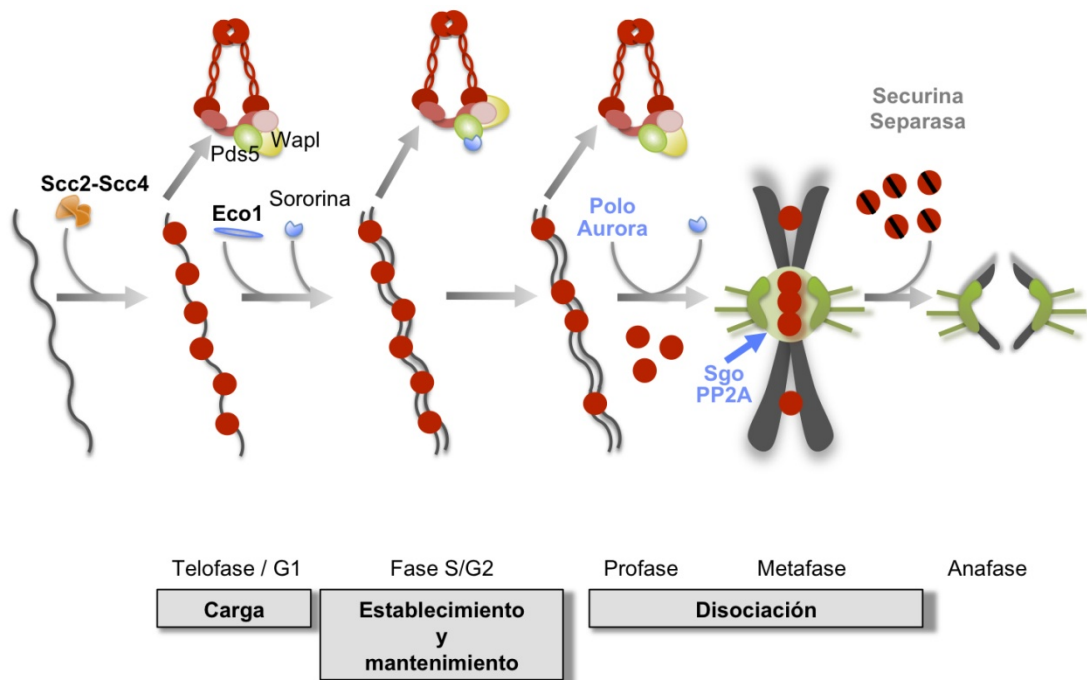


Figura 4. Regulación de la Cohesina durante el ciclo celular en vertebrados. La carga de Cohesina ocurre en G1 y depende de Scc2-Scc4. Durante la replicación, la acetiltransferasa Eco1 acetila la subunidad Smc3 y permiten la unión de Sororina, lo que conduce al establecimiento y estabilización de la cohesión. En profase se disocia la mayor parte de la Cohesina en un proceso regulado por las quinasas Polo y Aurora B. Este proceso requiere también la función de Wapl y Pds5. Una pequeña fracción de Cohesina permanece en cromatina, mayormente alrededor de los centrómeros, protegida de la disociación por Sgo-PP2A. En anafase, la Separasa corta los anillos de Cohesina que quedan en cromatina, previa degradación de la Securina por el complejo APC, lo que permite la separación de las cromátidas hermanas. En la parte superior de la imagen se muestra el complejo de Cohesina y los factores reguladores que se encuentran unidos a él en cada momento del ciclo.

La asociación de Cohesina con cromatina es un proceso dinámico, y parece que a lo largo de toda la interfase existe un equilibrio de complejos Cohesina que se unen a la cromatina por la acción de Scc2-Scc4 y se disocian por la acción desestabilizadora de Wapl-

Pds5. Mediante experimentos de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) se ha demostrado que existen varias poblaciones de Cohesina con diferente estabilidad en lo que se refiere a su asociación a la cromatina (Gause et al., 2010, Gerlich et al., 2006, Kueng et al., 2006). Es posible que la inestabilidad dinámica de la Cohesina sea importante para aliviar el problema que la presencia de estos anillos supone para otros procesos que ocurren en la cromatina, como la transcripción o la replicación (Terret et al., 2009). El carácter topológico de la asociación de Cohesina con cromatina permitiría el desplazamiento del anillo a lo largo de la fibra de cromatina. En *Saccharomyces cerevisiae* la Cohesina no colocaliza con Scc2-Scc4 y se ha propuesto que el anillo se desplaza o bien empujado por la maquinaria de transcripción (Lengronne et al., 2004, Glynn et al., 2004) o bien alejándose de sitios de carga masiva como parecen ser los centrómeros (Hu et al., 2011).

2.2 Establecimiento de la cohesión durante fase S

Durante la fase S del ciclo celular se replica el ADN y se establece la cohesión entre las cromátidas hermanas (Uhlmann and Nasmyth, 1998). Estos dos acontecimientos están acoplados mediante un proceso en el que están implicados factores reguladores de la cohesión y proteínas integrantes de las horquillas de replicación. La Cohesina, ya cargada en cromatina, debe convertirse en “cohesiva”. Para ello se requiere la función de Eco1/Ctf7, una acetil transferasa que viaja con las horquillas de replicación e interacciona con PCNA y el complejo que lo carga, Ctf18-RFC (*replication factor C*) (Lengronne et al., 2006, Tanaka et al., 2000, Skibbens et al., 1999, Toth et al., 1999). En *D. melanogaster* dos acetil transferasas, Deco (ortólogo de Eco1) y San, participan en el establecimiento de la cohesión (Williams et al., 2003). En células humanas encontramos dos ortólogos de Eco1, Esco1 y Esco2, con funciones no redundantes (Hou et al., 2007). Recientemente se ha demostrado que Esco2 se encarga específicamente de la acetilación de la Cohesina en la región pericentromérica (Whelan et al., 2012).

Eco1 acetila a la subunidad Smc3 de la Cohesina en dos lisinas contiguas, K112 y K113 (K105 y K106 en humanos) y su sustitución por argininas produce defectos graves de cohesión y letalidad en *S. cerevisiae* (Rolef Ben-Shahar et al., 2008, Rowland et al., 2009, Unal et al., 2008, Zhang et al., 2008a). Lo mismo ocurre con las mutaciones que afectan a la actividad acetiltransferasa de Eco1. Se ha propuesto que la acetilación de estas dos lisinas por Eco1 contrarresta la función “anti-establecimiento” de la cohesión que ejercen Wapl-Pds5 (Rowland et al., 2009, Sutani et al., 2009). Esto explicaría que la eliminación de Pds5 o Wapl rescate la letalidad que provoca la falta de Eco1 en levaduras. No está claro, sin embargo, si en estas condiciones realmente se establece cohesión por la Cohesina (Guacci

and Koshland, 2012). En *Schizosaccharomyces pombe*, la delección de Pds5 o Wapl también rescata la letalidad de mutantes en la acetiltransferasa Eso1 (Tanaka et al., 2001, Feytout et al., 2011) y en células humanas la eliminación Wapl alivia el fenotipo de separación prematura de las cromátidas hermanas que provoca la eliminación de Esco2 (Gandhi et al., 2006). Es posible que la acetilación de Smc3 provoque un cambio conformacional que dé como resultado el desplazamiento o la disminución de la afinidad de Wapl-Pds5 por el anillo y permita que la Cohesina pase a abrazar a las dos cromátidas hermanas (Figura 5). A favor de esta posibilidad está la observación de que un mutante no acetilable de Smc3 se une con mayor eficiencia a Pds5 en células humanas (Terret et al., 2009). En cualquier caso, se desconoce si en la transición de abrazar una cromátida a abrazar las dos requiere una apertura del anillo por las regiones *hinge* o por las cabezas SMC, o si se produce una disociación transitoria de la Cohesina de cromatina.

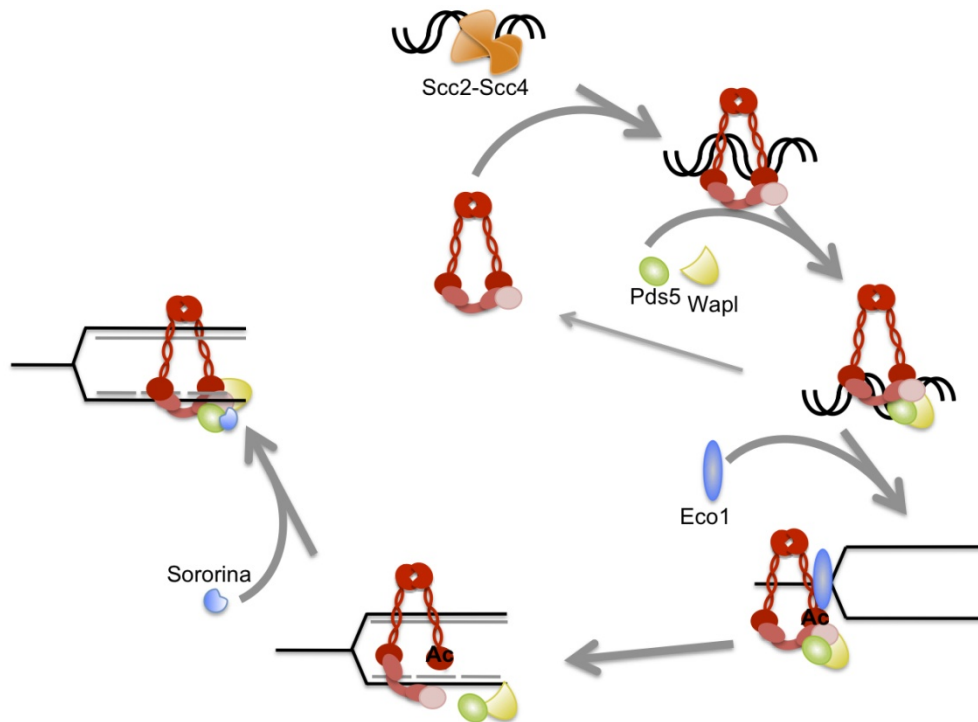


Figura 5. Mecanismo anti-establecimiento de Wapl-Pds5. Cohesina (en rojo) se carga en cromatina por la acción del complejo Nipbl-Mau2 (en naranja) durante telofase y G1. La acción de Wapl-Pds5 (en amarillo y verde, respectivamente) permite que esta asociación sea dinámica. Cuando comienza la replicación, las acetiltransferasas Eco acetilan la subunidad Smc3 del anillo, y se ha propuesto que esto contrarresta la acción anti-establecimiento de Wapl-Pds5, tal vez desplazando estos factores de forma transitoria y/o propiciando un cambio conformacional que permite que la Cohesina pase a abrazar a las dos cromátidas hermanas recién formadas. En metazoos, además, la acetilación es necesaria para la unión de Sororina (en azul), encargada de estabilizar la cohesión.

2.3 Mantenimiento de la cohesión en G2

En vertebrados, la acetilación de Smc3 va acompañada de la unión de Sororina a la Cohesina (Figura 5). Esta proteína, identificada inicialmente como un sustrato del APC/C

(*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) es esencial para establecer y mantener la cohesión (Lafont et al., 2010, Rankin, 2005). Se ha propuesto que la unión de Sororina desplaza a Wapl del sitio de unión con Pds5 (Nishiyama et al., 2010). Aunque Wapl no se disocia de la Cohesina, en esta nueva posición su capacidad desestabilizadora se vería muy reducida. Experimentos de FRAP sugieren que alrededor de un tercio de la Cohesina presente en la célula se une de forma muy estable al ADN después de la replicación (Gerlich et al., 2006). Esta fracción correspondería con la Cohesina que lleva Sororina. Así pues, la función principal de la acetilación de Smc3 sería permitir la asociación de Sororina y así desplazar a Wapl, lo que estabilizaría a la Cohesina “cohesiva”. No se han identificado ortólogos de Sororina en levaduras, por lo que es posible que existan mecanismos *alteARN*tivos de estabilización de la Cohesina que no requieran la función de esta proteína.

Una vez finalizada la fase S, Cdk1 fosforila a Eco1, lo que promueve su degradación mediada por la ubiquitín ligasa SCF, al menos en levaduras (Lyons and Morgan, 2011). De este modo, si bien Scc2-Scc4 puede seguir cargando Cohesina en G2, esta Cohesina no puede establecer cohesión. Sin embargo, cuando la presencia de roturas de doble cadena (DSB, *Double Strand Break*) activa la respuesta al daño, Eco1 se estabiliza y es posible generar cohesión en G2 (Unal et al., 2007, Strom et al., 2007). En esta circunstancia Eco1 acetila Scc1/Rad21, con el objetivo también de también evitar la función de Wapl (Heidinger-Pauli et al., 2008).

2.4 Disolución de la cohesión en mitosis

El mecanismo de disociación de Cohesinas difiere según los organismos. En levaduras, la Cohesina persiste en los centrómeros y a lo largo de los brazos cromosómicos hasta el inicio de anafase. En metazoos, sin embargo, la disolución de la cohesión ocurre en dos pasos, el primero en profase y el segundo al comienzo de anafase (Waizenegger et al., 2000, Losada et al., 2000) (Figura 4).

2.4.1 Disociación de Cohesina en profase

En este primer paso se elimina la mayor parte de la Cohesina que se encuentra en los brazos en un proceso mediado por la acción de las quinasas Polo y Aurora B (Gimenez-Abian et al., 2004, Hauf et al., 2005, Losada et al., 2002, Sumara et al., 2002). La primera fosforila la subunidad SA, en tanto que se desconoce la diana de Aurora B. La fosforilación en SA no es el único evento implicado en la disociación de Cohesina. La reducción de los niveles de Wapl mediante ARN de interferencia (ARNi) estabiliza la unión de Cohesina a cromatina, impide la disociación de profase y provoca un arresto en prometafase en el que los cromosomas

muestran las cromátidas hermanas si resolver. Por el contrario, la sobreexpresión de Wapl causa una disociación prematura de Cohesina (Gandhi et al., 2006, Kueng et al., 2006). Para permitir que Wapl ejerza su función en profase, Sororina se inactiva mediante fosforilación por Cdk1 a la entrada en mitosis (Dreier et al., 2011). En cuanto a Pds5, experimentos en extractos de *Xenopus* sugieren que su función es importante también en la disociación de profase, quizá facilitando la acción desestabilizadora de Wapl (Losada et al., 2005, Shintomi and Hirano, 2009).

La mayor parte de la Cohesina que permanece en los cromosomas metafásicos se localiza en la región centromérica, protegida de la disociación por una proteína denominada Shugoshina (Sgo). En muchos organismos existen dos proteínas de esta familia, Sgo1 y Sgo2. Sgo2 es esencial en meiosis, pero no en mitosis, al menos en ratones (Llano et al., 2008) y en extractos de *Xenopus* (Rivera et al., 2012). Sgo1 es la principal encargada de la protección de la Cohesina centromérica (Salic et al., 2004, McGuinness et al., 2005). Su localización en esta región depende de las quinasas Bub1 y Aurora B (Rivera and Losada, 2009, Resnick et al., 2006, Kitajima et al., 2005). Sgo1 se asocia a la fosfatasa PP2A, cuya actividad contrarresta la fosforilación de SA por Polo, evitando así la disociación de Cohesina (Tang et al., 2006, Riedel et al., 2006, Kitajima et al., 2006).

2.4.2. Disolución de la cohesión en la transición metafase/anafase

Para que las cromátidas hermanas puedan separarse, la Cohesina y las catenaciones que quedan en los cromosomas metafásicos deben eliminarse. La disociación de Cohesina sólo ocurre cuando todos los cromosomas están en la placa metafásica con cada cinetocoro hermano unido a microtúbulos de polos opuestos del huso. Esta condición desactiva el mecanismo de control de mitosis o SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), y pone en marcha la maquinaria de degradación dirigida por el APC/C (Musacchio and Salmon, 2007). Los principales sustratos de proteólisis son Securina y Ciclina B. La Securina es el inhibidor de la Separasa, una cisteína proteasa que corta la subunidad Scc1/Rad21, destruyendo así la integridad del anillo de Cohesina y permitiendo su disociación de la cromatina (Uhlmann et al., 1999, Hauf et al., 2001). La acción de Separasa elimina toda la Cohesina que queda tanto en los brazos como en la zona centromérica, incluso cuando se elimina Wapl (Kueng et al., 2006) o se expresa una versión no fosforilable de SA2 (Hauf et al., 2005). Sin embargo, no es capaz de cortar Cohesina soluble porque su actividad es dependiente de cromatina (Sun et al., 2009). En cuanto a las catenaciones, se sabe que la acción de topoisomerasa II se requiere en esta transición a anafase (Shamu and Murray, 1992). Un exceso de Cohesina dificulta la acción de la topoisomerasa II (Losada et al., 2002), en tanto que la condensación y

las fuerzas que ejercen los microtúbulos del huso facilitan la disolución de catenaciones (Farcas et al., 2011, Baxter et al., 2011).

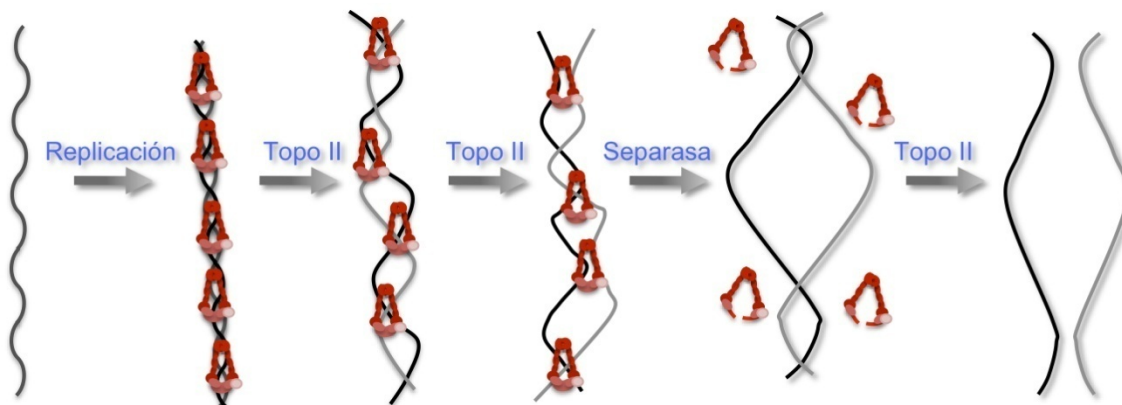


Figura 6. Disolución de la cohesión en anafase. Las catenaciones de ADN surgen durante la replicación, al mismo tiempo que se establece la cohesión entre cromátidas hermanas mediada por Cohesina. La decatenación de estas uniones mediante la acción de Topo II tiene lugar durante las fases S y G2. La eliminación total de las catenaciones la dificulta la presencia de Cohesina abrazando a las cromátidas. Una vez que se ha eliminado por completo la Cohesina mediante la acción de Separasa en la transición de metafase a anafase, Topoisomerasa II resuelve las catenaciones residuales, asegurando la separación total de las cromátidas hermanas.

3. Funciones de la Cohesina que implican cohesión

3.1 Importancia de la cohesión en la segregación cromosómica

El apareamiento de las cromátidas hermanas o cohesión es esencial para una correcta segregación de los cromosomas en mitosis y meiosis (Nasmyth and Haering, 2009). En mitosis, al mantener unidas a las cromátidas hermanas, la Cohesina permite a la célula reconocer las copias de cada cromosoma que deben llegar a cada una de las células hijas (Nasmyth et al., 2000). Esto es importante en células eucariotas porque los procesos de duplicación y segregación del material genético no ocurren simultáneamente, como es el caso en procariontes. También proporciona un mecanismo de control, pues la cohesión se opone a las fuerzas de los microtúbulos que tiran de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos del huso y genera una tensión que desactiva a Aurora B y el SAC. Cuando no hay tensión, bien porque los cinetocoros hermanos están unidos al mismo polo, bien porque no hay cohesión, Aurora B desestabiliza la interacción cinetocoro-microtúbulo con el resultado de un cinetocoro vacío al que se une el MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) que secuestra a Cdc20, activador indispensable del APC/C, inhibiendo la degradación de Securina y Ciclina B, e impidiéndose así la entrada en anafase (Musacchio and Salmon, 2007).

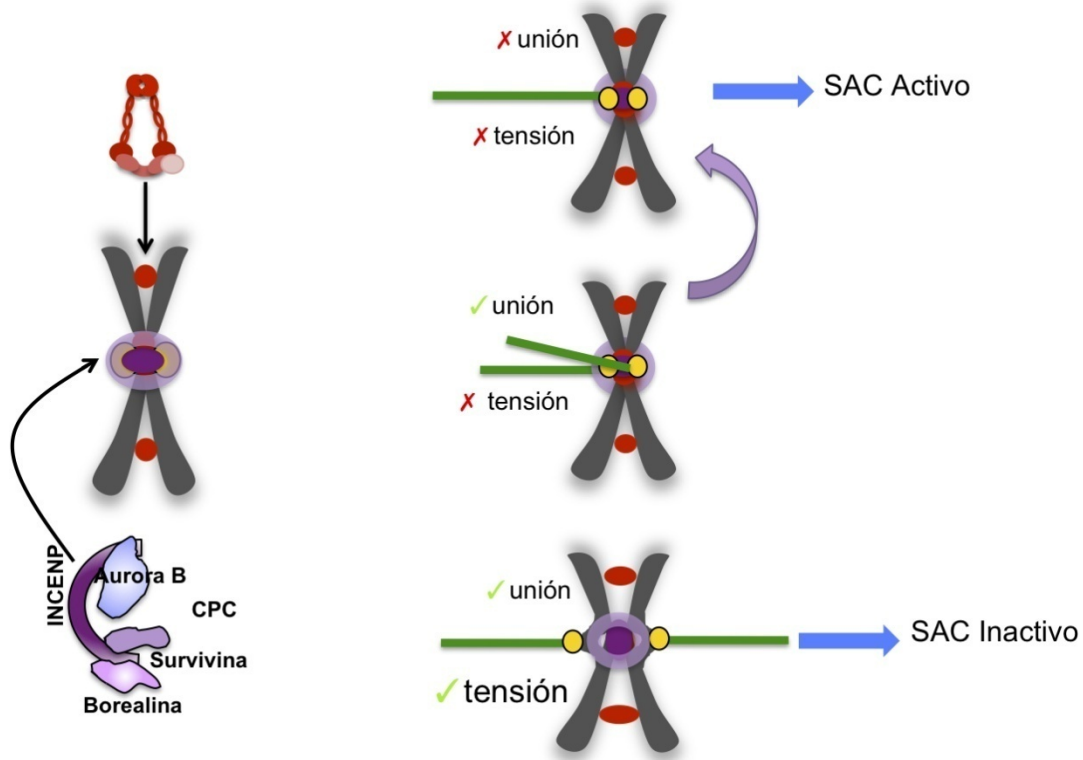


Figura 7. Implicación de Aurora B en el SAC Aurora B se encarga de corregir los errores de unión entre microtúbulos y cinetocoros que se generan de forma espontánea durante el proceso de biorientación de los cromosomas en metafase. Las uniones que no producen tensión entre los cinetocoros son desestabilizadas y se convierten en uniones monotéticas. Estas uniones mantienen el SAC activado y el complejo APC/C inhibido hasta que se reparan y se generan otras nuevas que producen tensión y por tanto dejan de ser señalizadas por el SAC. Durante el tiempo que el SAC se encuentra activo, las células no pueden progresar a anafase.

La localización centromérica de Aurora B es esencial para una correcta segregación cromosómica no sólo por su participación en el mecanismo de corrección de interacciones erróneas cinetocoro-microtúbulo que se acaba de describir, sino también porque dirige la acumulación del protector de la Cohesina, Sgo (Rivera et al., 2012). Aurora B forma parte del complejo CPC (*Chromosomal Passenger Complex*) junto con INCENP (*Inner Centromere Protein*), Survivina y Borealina (Ruchaud et al., 2007). En profase, el CPC aparece brevemente a lo largo de los brazos cromosómicos y fosforila a la histona H3 en la serina 10, pero enseguida se concentra en la región centromérica, entre las cromátidas hermanas. Para que esto ocurra, la quinasa Bub1 fosforila a la histona H2A de la región centromérica en la Serina 121 y esta marca es reconocida por Sgo1, quien a su vez parece estabilizar la unión del CPC al centrómero (Kawashima et al., 2010). Tanto Bub1 como Sgo1 (y Sgo2) requieren también al CPC para su correcta localización (Shintomi and Hirano, 2009, Tsukahara et al., 2010). Por otro lado, una quinasa denominada Haspin fosforila a la histona H3 en la Treonina 3, y genera así un sitio de unión para Survivina (Kelly et al., 2010, Wang et al., 2010). Experimentos en *S. pombe* sugieren que la acumulación de Haspin -y por tanto del CPC- en el centrómero

depende de Pds5 (Yamagishi et al., 2010). Cuando se reducen los niveles de Cohesina en células HeLa, se observa deslocalización del CPC en metafase (Losada et al., 2005, Yamagishi et al., 2010). En extractos de *Xenopus* carentes de Pds5 la disociación profásica de Cohesina falla y una fracción de Sgo1 y del CPC aparecen deslocalizadas a lo largo de los brazos cromosómicos (Shintomi and Hirano, 2009). Sin embargo, en cromosomas obtenidos en extractos sin Cohesina, y por tanto sin Pds5 en cromatina, se observa una localización correcta de Sgo1 y el CPC en el centrómero (Losada et al., 2005, Rivera and Losada, 2009). Así pues, no está claro qué mecanismo conduce a la deslocalización de Sgo y CPC en ausencia de Cohesina/Pds5 y cómo afecta dicha deslocalización al SAC y a la segregación cromosómica.

3.2 Papel de la Cohesina en reparación de daño al ADN

Durante la replicación del ADN se producen DSBs (*Double Strand Breaks*) que pueden repararse por NHEJ (*non-homologous end-joining*) o recombinación homóloga (HR), siendo este último mecanismo el que ocurre preferentemente. El uso de la cromátida hermana como molde para reparar el ADN dañado preserva la información genética original. La reparación de DSBs mediante recombinación homóloga depende de Cohesina tanto en *S. cerevisiae* (Schar et al., 2004, Sjogren and Nasmyth, 2001) como en vertebrados (Sonoda et al., 2001, Potts et al., 2006). Puesto que es la cohesión entre las cromátidas lo que facilita la reparación por HR, no es de extrañar que la presencia de Sororina sea también esencial para este proceso (Schmitz et al., 2007).

La dinámica del propio proceso replicativo también depende de la cohesión, especialmente en regiones como los telómeros. La naturaleza repetida de las secuencias teloméricas y la formación de estructuras como el loop-T hacen que las horquillas replicativas se atasquen con frecuencia en los telómeros (Gilson and Geli, 2007). La cohesión mediada por la Cohesina-SA1 es esencial para evitar el colapso de estas horquillas y promover su reiniciación mediante HR (Remeseiro et al., 2012a).

Además de su función en reparación de daño, la Cohesina está implicada en la regulación del punto de control de daño interno de la fase S (*intra-S checkpoint*) y el de transición G2/M, aunque de forma independiente a su función cohesiva. La fosforilación de Smc1 y Smc3 mediada por ATM parece esencial para la inducción del *checkpoint* en respuesta a radiación ionizante (IR) (Luo et al., 2008, Kim et al., 2002, Yazdi et al., 2002). En este caso, la Cohesina aparece como molécula señalizadora, cuya acumulación facilita el reclutamiento de proteínas de respuesta a daño en la región afectada. La reducción de Cohesina mediante ARN interferente en células humanas impide una activación apropiada de

Chk2 y la acumulación de 53BP1 en los focos de daño generado por irradiación (IR) (Watrin and Peters 2009).

4. Funciones de la Cohesina en interfase independientes de la cohesión

Se ha visto que Cohesina se expresa de forma ubicua incluso en aquellos tejidos en los que no hay replicación del ADN y por tanto no se requiere cohesión (Wendt et al., 2008, Pauli et al., 2008). Esto sugiere que Cohesina tiene otras funciones además de la cohesión. Experimentos en *Drosophila* habían sugerido que el complejo podía estar implicada en la regulación de la expresión génica, pues se había identificado el homólogo de Scc2 (Nipped-B) en una búsqueda de factores que facilitan la activación de ciertos genes homeóticos por *enhancers* distantes (Rollins et al., 1999). En los últimos años han sido numerosos los artículos en los que se describe la contribución de Cohesina a la regulación transcripcional (Rollins et al., 2004, Horsfield et al., 2007, Lin et al., 2011, Pauli et al., 2010, Schaaf et al., 2009, Pauli et al., 2008, Hallson et al., 2008, Dorsett et al., 2005). Experimentos de 3-C (*Chromosome Conformation Capture*) y evidencias adicionales sugieren que la Cohesina lleva a cabo esta función gracias a su capacidad de unir dos segmentos de ADN no sólo en *trans* (las cromátidas hermanas) sino también en *cis* (dos segmentos dentro de la misma cromátida, que forman la base de un lazo de cromatina, Figura 9A) (Hadjur et al., 2009, Mishiro et al., 2009, Chien et al., 2011, Nativio et al., 2009, Hou et al., 2010, Seitan et al., 2011). Para ello, la Cohesina colabora con otros factores entre los que destaca CTCF, una proteína conocida por su labor como “aislante” y que colocaliza con la Cohesina en muchos sitios de unión a lo largo de los genomas humano y de ratón (Wendt et al., 2008, Rubio et al., 2008, Parelho et al., 2008, Remeseiro et al., 2012b). La Cohesina también se encuentra en otros sitios a los que se unen factores de transcripción específicos de tejido y se especula que al estabilizar lazos de cromatina junto a estos otros factores, contribuye a determinar los programas transcripcionales que definen cada tipo celular (Schmidt et al., 2010). En células madre murinas, la Cohesina interacciona con Mediator, un coactivador transcripcional, y juntos facilitan la formación de un lazo de cromatina que pone en contacto a *enhancers* y promotores de genes cuya expresión es importante para mantener el estado pluripotencial (Figura 9, derecha) (Kagey et al., 2010).

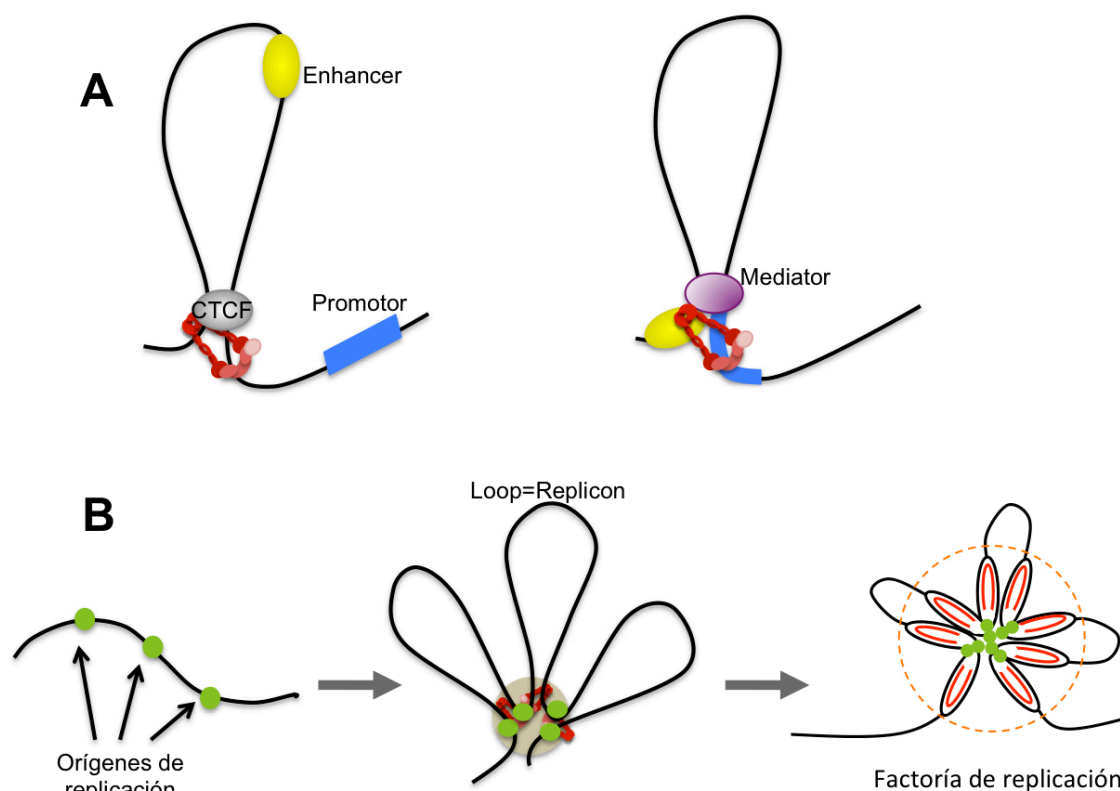


Figura 8. Cohesina participa en la organización topológica de la cromatina en el núcleo interfásico. A. Cohesina se une a dos segmentos de ADN en *cis* en la base de un lazo de cromatina y lo estabiliza. Para ello interacciona con factores como el CTCF (izquierda) o Mediator (derecha). La formación de estos lazos regula la expresión génica al impedir o facilitar la comunicación entre *enhancers* y promotores, acercar elementos reguladores de la expresión génica que se encuentran distantes en el cromosoma y que sin la ayuda de esta organización topológica no podrían interaccionar. B. Cohesina ayuda a organizar factorías de replicación acercando orígenes (en verde) que se activan simultáneamente.

La capacidad de la Cohesina para organizar la cromatina en el núcleo interfásico tiene otras consecuencias además de regular la expresión génica. Un estudio reciente propone que Cohesina organiza los lazos que se forman en torno a las factorías de replicación para acercar orígenes distantes que se activan así de forma sincrónica, lo que aumenta la eficiencia de la replicación (Figura 9B), (Guillou et al., 2010). Además, la Cohesina facilita la recombinación V(D)J (Degner et al., 2009) y es esencial para el reordenamiento de los receptores de células T (Seitan et al., 2011).

5. Cohesinas y enfermedad

5.1 Cohesinopatías

El término cohesinopatía engloba a las enfermedades genéticas debidas a mutaciones en genes que codifican subunidades de Cohesina u otras proteínas relacionadas con ella. Las principales cohesinopatías descritas hasta el momento son el síndrome de Roberts/SC

phocomelia (RBS) y el síndrome de Cornelia de Lange (CdLS). Los pacientes afectados por ambos síndromes muestran numerosos problemas de desarrollo entre los que cabe destacar el retraso mental y en el crecimiento, deformidades en las extremidades, paladar sin cerrar y anomalías faciales (Liu and Krantz, 2008).

El síndrome de Roberts/SC phocomelia tiene carácter autosómico recesivo y se debe a la mutación en ESCO2 (Vega et al., 2005). La mayoría de los casos descritos corresponden a mutaciones que dan lugar a una proteína truncada o inactiva (Vega et al., 2010). Las células de los pacientes presentan aneuploidía, micronúcleos, problemas de proliferación, sensibilidad al daño al ADN producido por mitomicina C o etopósido y una morfología característica de los cromosomas metafásicos en los que las regiones de heterocromatina parecen haber perdido la cohesión (Musio et al., 2004, Gordillo et al., 2008, Vega et al., 2005).

En el caso de los pacientes de CdLS, más de la mitad presentan mutaciones heterocigotas en NIPBL (homólogo de Scc2) y un pequeño número tienen mutaciones en SMC1 o SMC3 (Krantz et al., 2004, Tonkin et al., 2004, Musio et al., 2006 38, Deardorff et al., 2007). La patología asociada a estos pacientes es muy variable, y no está clara la relación entre dicha patología y la mutación que la origina, si bien se ha visto que los casos mas leves de la enfermedad son los debidos a mutaciones en SMC1 y SMC3 mientras que los mas graves son los causados por mutaciones en NIPBL. Las células de estos pacientes son más sensibles a mitomicina C y a rayos X cuando estos se aplican en G2, posiblemente debido a que el papel de Cohesina en reparación de daño se encuentra afectado. Sin embargo, no se han observado defectos de cohesión evidentes en los cromosomas mitóticos (Castronovo et al., 2009). En cambio, sí parece haber cambios transcripcionales que podrían ser los responsables de las anomalías observadas a nivel de desarrollo (Liu et al., 2009).

Así pues, estas dos cohesinopatías parecen reflejar alteraciones en distintas funciones del complejo Cohesina. Mientras que en RBS la función afectada parece ser la cohesión, en CdLS las evidencias apuntan a la transcripción. Estas hipótesis se apoyan también en el estudio de modelos animales de pez cebra, mosca y ratón, que intentan recapitular estos síndromes. Uno de los modelos para CdLS, el ratón heterocigoto para NIPBL, presenta alteraciones en transcripción pero una cohesión robusta (Kawauchi et al., 2009). Sin embargo, el estudio de un pez cebra deficiente en Esco2 sugiere que los fenotipos observados tienen como origen defectos de proliferación celular y apoptosis (Monnich et al., 2011).

5.2 Cohesinas y cáncer

Hasta hace muy poco eran escasas las evidencias de la implicación de mutaciones somáticas en genes de Cohesina o sus factores reguladores en tumorigénesis (Xu et al., 2011). Una de ellas es un estudio en el que se secuenciaron 102 genes implicados en segregación cromosómica, entre ellos las Cohesinas, en un panel de 132 muestras de tumores colorrectales. De las 11 mutaciones identificadas, 10 se encontraron en factores relacionados con la cohesión incluyendo SMC1A, SMC3, SA3 Y NIPBL (Barber et al., 2008). En pacientes de cohesinopatías tampoco parece haber un incremento de riesgo de cáncer, pero esto puede ser en parte debido a la menor esperanza de vida de estos pacientes o a un seguimiento inadecuado (Mannini et al., 2010). En los estudios publicados sobre modelos de ratón deficientes en genes de Cohesina y factores asociados no se habla de cáncer con una excepción. En nuestro grupo hemos observado que los ratones heterocigotos para SA1 presentan una mayor incidencia de tumores espontáneos. Por otro lado, estos animales muestran protección frente al desarrollo de tumores en ensayos de carcinogénesis inducida químicamente. Nuestra interpretación es que la menor capacidad proliferativa de las células con menos SA1 dificulta el crecimiento de tumores agresivos, en tanto que su inestabilidad cromosómica puede propiciar en algunos contextos la aparición espontánea de tumores (Remeseiro et al., 2012a).

Hace pocos meses un estudio identificó mutaciones en el gen que codifica SA2, que se encuentra en el cromosoma X, en un número muy significativo de cánceres humanos, glioblastomas y melanomas principalmente (Solomon et al., 2011). Es muy probable que la secuenciación masiva de tumores proporcione nuevos datos acerca del papel de las Cohesinas en cáncer. Será entonces importante entender qué función del complejo (segregación cromosómica, reparación, regulación de la transcripción) es la responsable de la malignidad.

6. Las proteínas Pds5

El factor Pds5 (*Precocious dissociation of sisters*) se identificó en *screenings* genéticos en hongos y levaduras junto con otros factores de cohesión relevantes para la correcta segregación en meiosis y en mitosis (Denison et al., 1993, Holt and May, 1996, Hartman et al., 2000, Panizza et al., 2000). Estas proteínas están conservadas desde levaduras hasta humanos, pero mientras que en levaduras hay solo una, en vertebrados existen dos proteínas Pds5, Pds5A y Pds5B (Losada et al., 2005, Sumara et al., 2000),(Figura 9A). Ambas presentan una alta homología de secuencia que sólo se interrumpe en el extremo carboxilo terminal. En este extremo, Pds5B contiene dos dominios AT-hook de unión a ADN y Pds5A

sólo uno, aunque con la secuencia degenerada (Figura 9B). Como se ha dicho en el apartado 1.1, Pds5 se caracteriza por estar compuesta por numerosos dominios HEAT repetidos en tándem (Figura 9B), que podrían ser los responsables de la interacción de Pds5 con Wapl y Sororina. Cabe señalar que la subunidad SA de la Cohesina y las subunidades CAP-G y CAP-D2 de la Condensina también poseen dominios HEAT (Neuwald and Hirano, 2000), lo que sugiere que existe una arquitectura común en los complejos SMC que participan en la dinámica cromosómica.

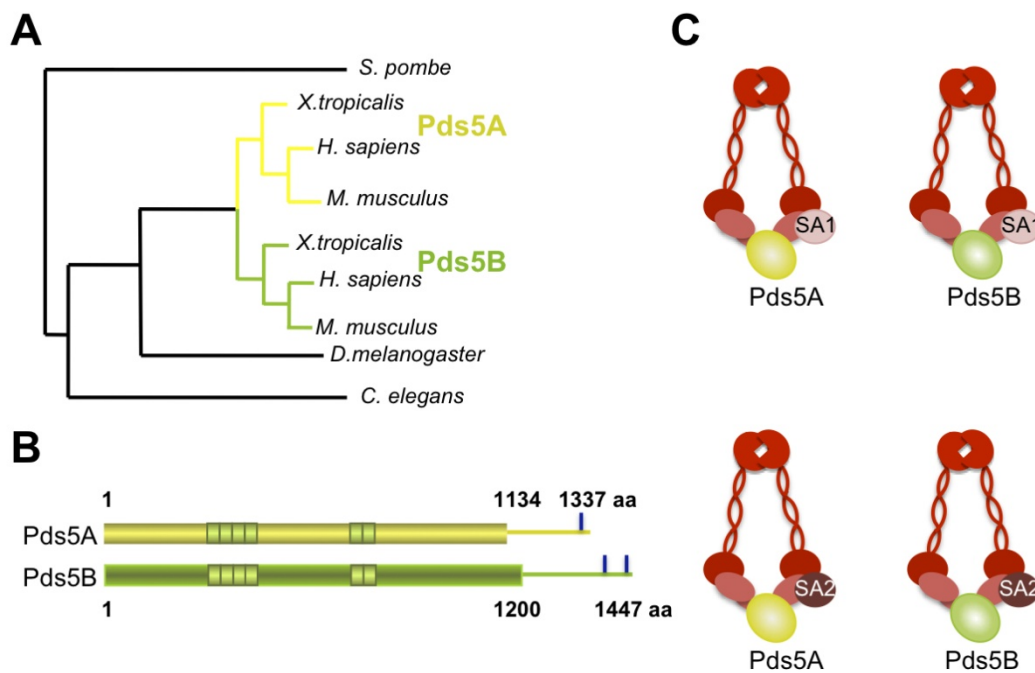


Figura 9. Las proteínas Pds5. **A.** Representación en árbol de la aparición de las dos versiones de Pds5 durante la evolución. En organismos inferiores solamente existe una versión de la proteína mientras que en vertebrados hay dos. **B.** Estructura de Pds5A y Pds5B. Los cuadros verdes representan las repeticiones HEAT y las barras azules los dominios AT-hook de unión a ADN. **C.** Cada complejo Cohesina solo lleva unido Pds5A o Pds5B. Por lo que finalmente existen cuatro variantes del complejo en función de si llevan SA1 o SA2, Pds5A o Pds5B.

La función de Pds5 en cohesión es compleja, pues como ya se ha mencionado con anterioridad parece servir como plataforma de unión para factores de cohesión con efectos opuestos sobre la asociación de Cohesina a la cromatina, Wapl y Sororin. En diferentes organismos podrían primar uno u otro aspecto de la función de Pds5, lo que podría explicar los distintos fenotipos que produce su eliminación. Así, los hongos *Aspergillus* y *Sordaria* muestran requerimientos de BimD6/Spo76 en cohesión y condensación tanto en mitosis como en meiosis (van Heemst et al., 2001, van Heemst et al., 1999). En *S. cerevisiae*, Pds5 es un gen esencial, cuya función es necesaria para establecer y mantener la cohesión (Hartman

et al., 2000, Panizza et al., 2000). En *S. pombe*, sin embargo, la delección de Pds5 no es letal, si bien la viabilidad de las células se reduce drásticamente al arrestarlas células en G2 o mitosis y se observan entonces graves defectos de cohesión (Wang et al., 2002, Tanaka et al., 2001). En *Caenorhabditis elegans* los defectos de cohesión que se producen en los mutantes de Pds5 son más severos en meiosis que en mitosis (Wang et al., 2003). En *D. melanogaster* la eliminación total de Pds5 es letal en estadios tempranos del desarrollo y se observa una separación prematura de cromátidas hermanas y aneuploidía (Dorsett et al., 2005). En extractos de huevos de *Xenopus laevis* la eliminación de Pds5A/B dificulta la disociación de Cohesina en profase, pero al mismo tiempo provoca defectos de cohesión centromérica (Shintomi and Hirano, 2009, Losada et al., 2005). Por otro lado, en células humanas HeLa, la eliminación por separado de Pds5A y Pds5B mediante ARNi produce defectos de cohesión moderados (Losada et al., 2005). Los ratones *knockout* (KO) para Pds5A y Pds5B sufren muerte perinatal y presentan defectos en organogénesis que recapitulan algunas patologías de pacientes CdLS (Zhang et al., 2009, Zhang et al., 2007). Sin embargo, las células procedentes de estos ratones no parecen tener defectos de cohesión.

Se ha estimado que un 20-30% de la Cohesina presente en la célula lleva unida Pds5 (Losada et al., 2005). Por otro lado, alrededor del 60% de Cohesina está unido a cromatina (Gerlich et al., 2006). Puesto que Pds5 sólo se une de forma estable a la Cohesina una vez que ésta se asocia a la cromatina, podemos deducir que sólo la mitad de los complejos Cohesina presentes en cromatina llevan una molécula de Pds5. Si estos cálculos son correctos, cabe especular que o bien Pds5 ejerce su función sobre complejos cercanos o bien en algunos casos Cohesina no requiere la presencia de Pds5. Se sabe muy poco del papel de Pds5 en funciones de la Cohesina distintas de la cohesión, si bien algunas evidencias apuntan a su participación en regulación de la expresión génica. En *D. melanogaster*, mutantes en Pds5 que reducen la cantidad de Cohesina en cromatina activan la expresión del gen *cut* (Dorsett et al., 2005). Los modelos de ratón deficientes en Pds5A o Pds5B, que presentan defectos de desarrollo, hacen pensar en una posible alteración en los patrones transcripcionales durante el desarrollo embrionario (Zhang et al., 2009, Zhang et al., 2007). Por otro lado, Pds5B regula la inhibición de la proliferación mediada por andrógenos en próstata (Geck et al., 1999, Maffini et al., 2008). También se ha descrito que la reducción de los niveles de Pds5B en células de carcinoma embrionario mediante ARNi altera la expresión de genes importantes para mantener el estado pluripotencial (Sox2, Nanog y Oct4) y produce problemas de diferenciación (Denes et al., 2010).

Así pues, cada complejo Cohesina consta de una de las dos versiones de SA (SA1 o SA2) y Pds5 (Pds5A o Pds5B), de modo que en las células somáticas de organismos vertebrados pueden existir al menos cuatro complejos Cohesina distintos (Figura 9C). ¿Cuál es la especificidad funcional, temporal o espacial de estos complejos? Existen evidencias de que Cohesina-SA1 y Cohesina-SA2 son responsables de la cohesión del telómero y el centrómero (Remeseiro et al., 2012a, Canudas and Smith, 2009). También se ha descrito una mayor implicación de Cohesina-SA1 en la regulación transcripcional en tanto que la Cohesina-SA2, al mediar la cohesión centromérica, sería más crucial en segregación cromosómica (Remeseiro et al., 2012b). Experimentos de ARNi en células HeLa sugieren que Pds5A podría ser mas importante para la cohesión a lo largo de los brazos cromosómicos y Pds5B para cohesión centromérica (Losada et al., 2005). Para profundizar en el análisis de las funciones de Pds5A y Pds5B, decidimos generar modelos de ratón deficientes en los genes que codifican estas proteínas. Esto nos permite, por un lado, trabajar en un sistema en el que la eliminación de cada proteína es completa, a diferencia de lo que ocurre en los estudios que emplean ARNi. En segundo lugar, ofrece la posibilidad de ir más allá del contexto celular y observar el efecto de la falta de estas proteínas en el desarrollo de un organismo complejo y su posible papel en enfermedades como las cohesinopatías y el cáncer.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La Cohesina es un elemento fundamental para la correcta segregación cromosómica, ya que es la principal encargada de mediar el apareamiento entre las cromátidas hermanas o cohesión. Factores adicionales regulan la interacción de este complejo con la cromatina, entre los que destaca Pds5. Los estudios respecto a la manera en que estas dos proteínas modulan la función de Cohesina son pocos y ofrecen resultados contradictorios o poco concluyentes. En vertebrados, además, existen dos versiones de esta proteína, Pds5A y Pds5B. El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en el análisis funcional de las proteínas Pds5 y determinar la especificidad de cada una de estas versiones. Para ello hemos seguido los siguientes pasos:

-Generación de dos modelos de ratón *knock out* condicionales para Pds5A y Pds5B que nos permitiesen estudiar el efecto de la eliminación total de estas proteínas no solo a nivel celular, sino también a nivel de organismo.

- Análisis del papel de Pds5A y Pds5B en el desarrollo embrionario.
- Análisis del papel de Pds5A y Pds5B en la progresión a través del ciclo celular.
- Estudio del efecto de la falta Pds5A o Pds5B en el comportamiento de la Cohesina y sus otros factores reguladores.
- Estudio de los fenotipos de cohesión y segregación cromosómica asociados a la falta de Pds5A y Pds5B.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización de las proteínas Pds5

1.1 Comportamiento a lo largo del ciclo celular

El trabajo de esta tesis se centra en la caracterización las proteínas Pds5. Comenzamos por estudiar su relación con las subunidades del complejo Cohesina. Ya se ha descrito que Pds5A y Pds5B interaccionan tanto con Cohesina-SA1 como con Cohesina-SA2 (Losada et al., 2005). En experimentos de inmunoprecipitación en extractos en los que se ha solubilizado la fracción unida a cromatina observamos además que ambas proteínas interaccionan con Sororina y con Wapl (Figura 10). Así, en lo que se refiere a interacciones con factores de cohesión y dinámica en el ciclo celular no encontramos ninguna diferencia entre Pds5A y Pds5B.

A continuación, estudiamos el comportamiento a lo largo del ciclo celular utilizando para ello células HeLa, ya que se sincronizan con facilidad. Se pararon las células en la fase G1/S mediante un protocolo clásico de tratamiento con timidina, y tras eliminar la droga del medio se añadió nocodazol para detener el ciclo en mitosis y evitar la entrada en la siguiente G1. Se tomaron muestras a distintos tiempos que se analizaron mediante citometría de flujo (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) e inmunoblot tanto de extractos totales como de fracciones enriquecidas en cromatina (Figura 11A). Observamos que el comportamiento de las dos proteínas Pds5 es muy parecido entre sí y muy similar a su vez al de las Cohesinas (Rad21, SA1, SA2): se asocian a la cromatina en G1, se mantienen unidas durante fase S y G2 y sólo se disocian en mitosis. Lo mismo se ve mediante inmunofluorescencia (Figura 10B). Además, cabe señalar que la cantidad total de Pds5A y Pds5B apenas varía en las distintas fases del ciclo, a excepción de mitosis, donde se puede detectar una bajada de la cantidad total de Pds5B más acusada de la que se detecta para Pds5A.

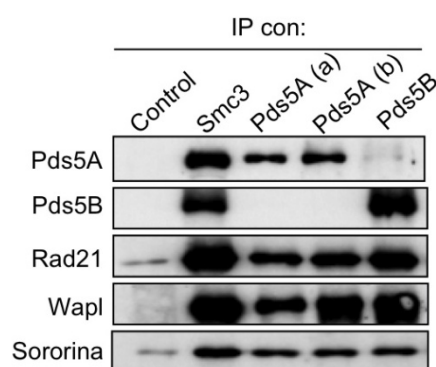


Figura 10: Pds5A y Pds5B interaccionan con Sororina y Wapl. Análisis por western blot de los inmunoprecipitados obtenidos a partir de un extracto nuclear de células HeLa, enriquecido en cromatina, con los anticuerpos indicados. IP, inmunoprecipitación. Pds5A(a) y Pds5A(b) son dos anticuerpos distintos generados contra un péptido C-terminal y contra un fragmento de proteína recombinante, respectivamente.

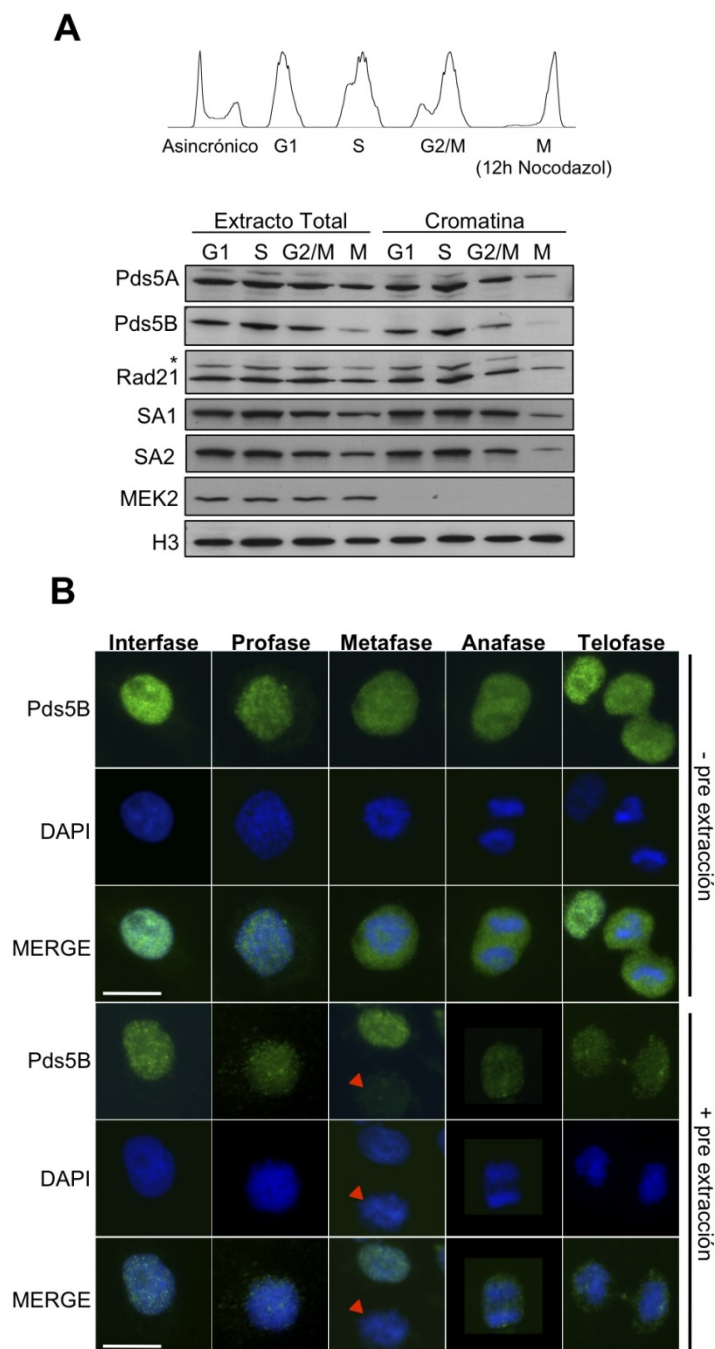


Figura 11: Comportamiento de las proteínas Pds5 a lo largo del ciclo celular. **A.** Análisis por western blot de muestras de células HeLa en la fase de ciclo celular indicada, tanto de extracto total como de la fracción de cromatina. Los perfiles de FACS de cada muestra aparecen en la parte superior de la figura. El asterisco en el western blot de Rad21 corresponde a la señal de una incubación anterior de la misma membrana con otro anticuerpo. **B.** Análisis de la distribución de Pds5B en el ciclo celular mediante microscopía de fluorescencia en células HeLa tratadas sin (panel superior) o con (panel inferior) detergente antes de la fijación para la fracción de proteínas solubles (tratamiento de pre-extracción, ver Materiales y Métodos, apartado 2.11). Barra de escala: 20 μ m.

1.2 Expresión de Pds5A y Pds5B en células y tejidos de ratón.

Para analizar la abundancia de Pds5A y Pds5B en distintas líneas celulares y tejidos de ratón desarrollamos un método que nos permite medir la cantidad absoluta de los ARNs mensajeros (ARNm) correspondientes mediante PCR cuantitativa (ver Materiales y Métodos, apartado 3.4). En todos los casos las cantidades de ambos transcritos son similares y varían en un factor de tres a lo sumo. En fibroblastos y en neuronas embrionarias la cantidad de ARNm de Pds5A es 2,5 veces superior a la de Pds5B, mientras que en células embrionarias pluripotenciales (*Embryonic Stem*, ES) y en células C2C12 (mioblastoma) la cantidad de ambos transcritos es muy similar (Figura 12A). Los genes que codifican Pds5A y Pds5B se expresan en todos los tejidos de ratón adulto examinados, si bien son más abundantes en pulmón, testículo, bazo y timo, tejidos en los que hay mayor proliferación (Figura 12B). Por tanto, no encontramos una expresión específica de tejido para Pds5A y Pds5B.

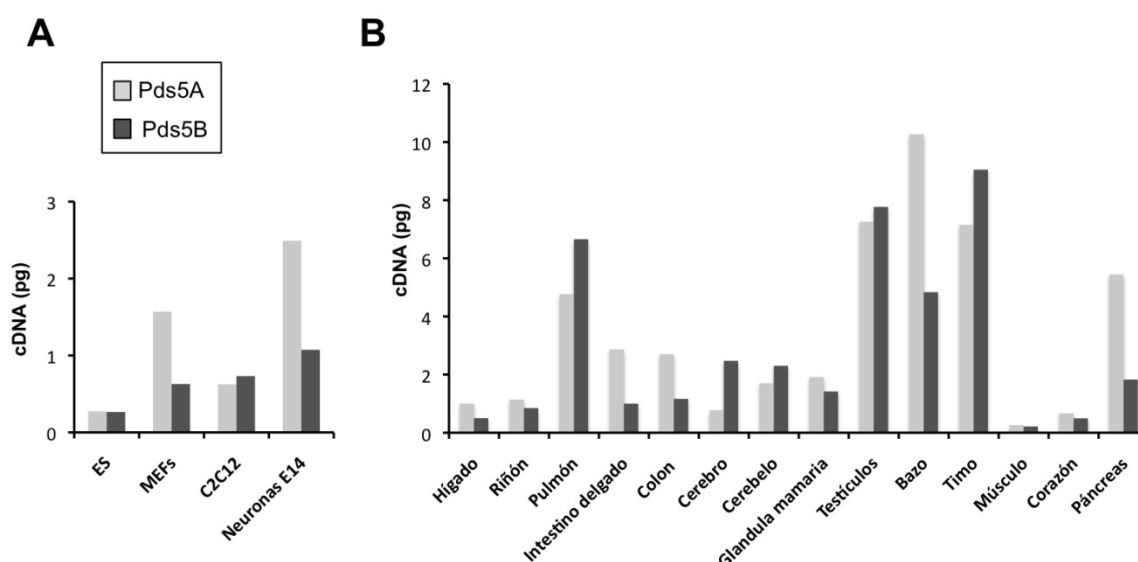


Figura 12: Expresión ubicua de Pds5A y Pds5B en células y tejidos murinos. Análisis de la abundancia de los ARNm de Pds5A y Pds5B mediante PCR cuantitativa en diferentes tipos celulares de ratón **(A)** y tejidos que se indican **(B)**. ES, células embrionarias pluripotenciales; MEF, fibroblastos embrionarios; C2C12, línea celular de mioblastoma; E14 neuronas, neuronas procedentes de embriones en estadio 14.

2. Modelos de ratón deficientes en Pds5A y Pds5B

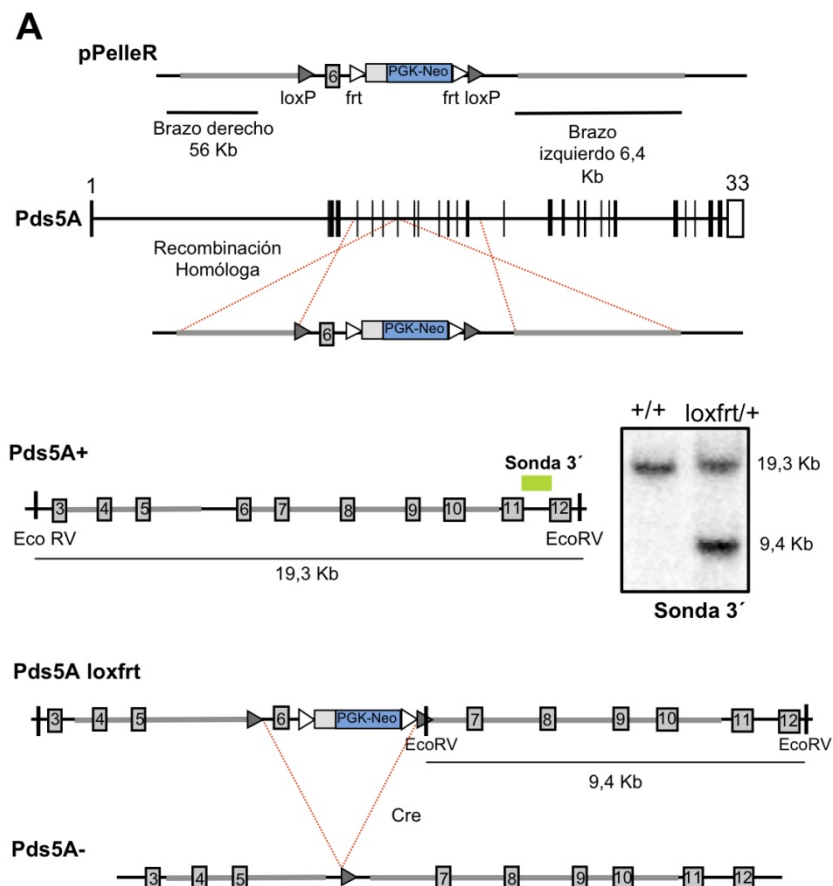
2.1 Generación de modelos de ratón deficientes para Pds5A y Pds5B

Para generar alelos *knockout* condicionales para los genes Pds5A y Pds5B se usó *gene targeting*. Esta técnica consiste en flanquear uno o varios exones del gen elegido con sitios *loxP* que son reconocidos por la recombinasa Cre. Al producirse la recombinación entre dichos sitios, se elimina la secuencia comprendida entre ellos y se consigue controlar la expresión de Cre en el tiempo (por ejemplo, para que se ocurra sólo en adulto) o en el espacio (en tejidos

concretos). Si bien los alelos de Pds5A y Pds5B que se han generado y que se describen a continuación son alelos condicionales, en el trabajo que se presenta en esta tesis sólo hemos analizado las consecuencias de la expresión eliminación del gen en todo el embrión mediante cruce con una recombinasa Cre que se expresa de forma sistémica.

Para la generación de la línea deficiente en Pds5A se diseñó un vector de *targeting* con brazos de homología de 5,6 kb y 6,4 kb. Los sitios *loxP* y *frt* (*flippase recognition target*; a ambos lados de un gen de selección que confiere resistencia a neomicina) se colocaron de forma que permitían en un solo paso la eliminación tanto del casete de neomicina como del exón diana, que en este caso fue el exón 6 (Figure 13A). Animales homocigotos para el alelo portador de la construcción (Pds5A *loxfrt*) se cruzaron con animales transgénicos CMV-Cre, que expresan la recombinasa en todo el organismo, consiguiendo así el alelo nulo (Pds5A⁻).

En el caso de Pds5B, los brazos de homología del vector son de 5,3 kb y 4,6 kb y los sitios *loxP* enmarcan los exones 4-5, en tanto que las secuencias *frt* flanquean únicamente el casete de neomicina (Figura 13B). Se generaron ratones portadores de un alelo con toda la construcción (Pds5B *loxfrt*) que se cruzaron primero con animales portadores de Flipasa consiguiéndose así el alelo condicional (Pds5B *lox*). Para la generación del alelo nulo (Pds5B⁻), se emplearon cruces con animales transgénicos CMV-Cre como hicimos en el caso de Pds5A .



B

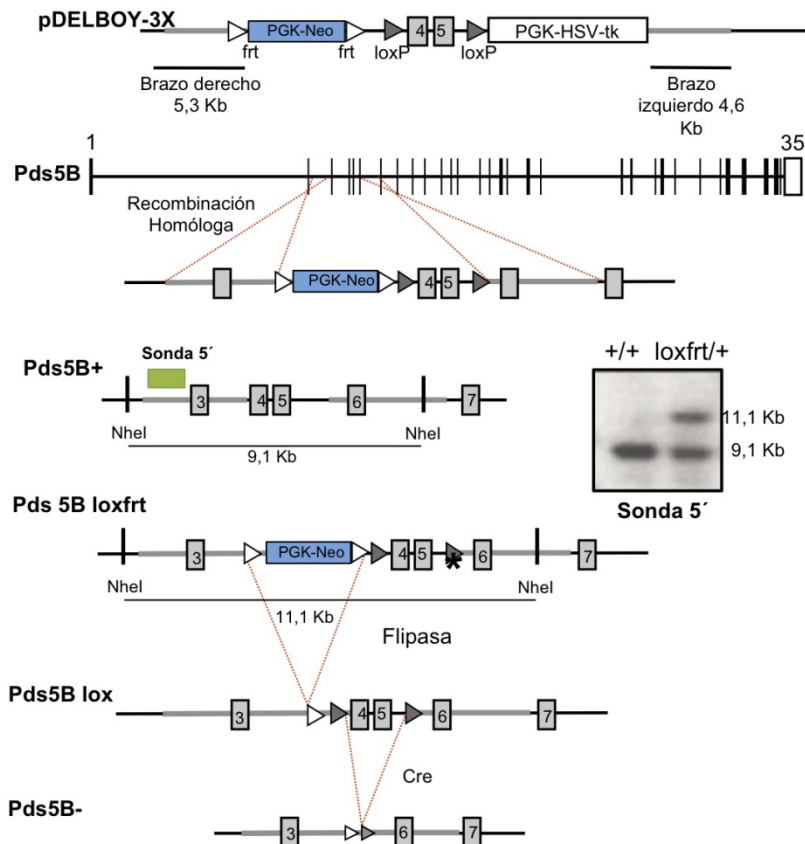


Figura 13. Generación del modelos *knock out* condicionales para Pds5A y Pds5B. A. Esquema resumen de la estrategia seguida para la generación de los alelos que se indican de Pds5A. Se muestra un *southern blot* de células madre embrionarias con la construcción integrada (loxfrt/+) o no (control). B. Proceso de generación del alelo nulo de Pds5B. Se muestra un *southern blot* de células madre embrionarias con la construcción integrada (loxfrt/+) o no (control, +/+).

2.2. Pds5A y Pds5B son necesarias para completar el desarrollo embrionario

Con el objetivo de estudiar las consecuencias de la pérdida de expresión de Pds5A y Pds5B *in vivo*, se establecieron cruces entre ratones Pds5A^{+/-} y entre ratones Pds5B^{+/-}. Entre la descendencia viva de estos cruces (más de 500 crías) no se encontraron animales portadores del alelo nulo en homocigosis. Para determinar en qué momento del desarrollo embrionario se producía la muerte se extrajeron camadas en diferentes estadios del desarrollo embrionario, desde día 12,5dpc (*days post-coitus*) hasta día 18,5dpc, muy próximo al término de la gestación. El análisis de las frecuencias con las que aparece cada genotipo indica que la letalidad aparece en las etapas finales del desarrollo embrionario, pudiendo identificarse algunos animales *knock out* a día 18,5dpc (Figura 14 A). En ambos casos, estos embriones *knock out* son fácilmente distinguibles de sus hermanos de camada por su menor tamaño, si

bien el retraso en el crecimiento es más evidente en embriones deficientes en Pds5A (Figura 14B).

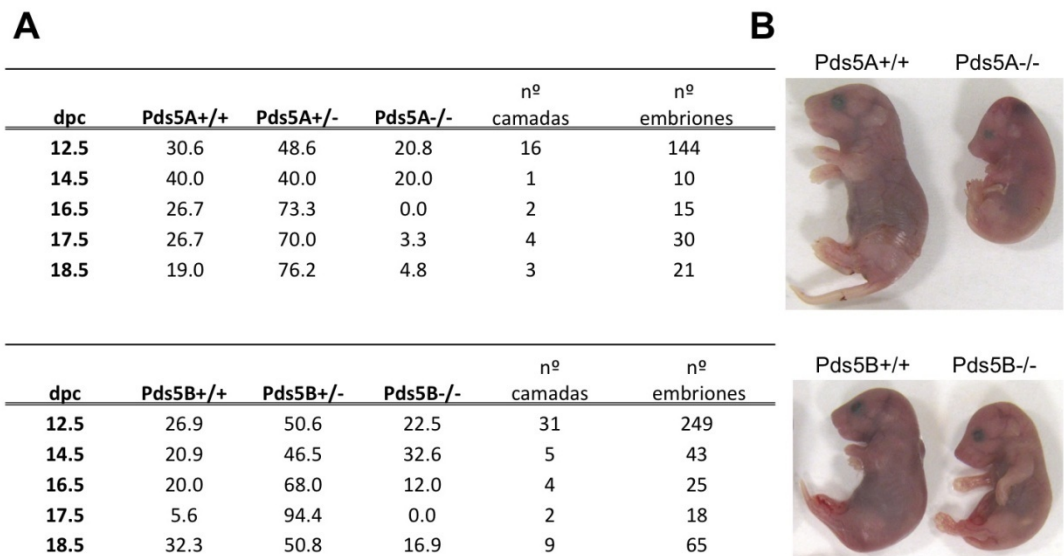


Figura 14. La falta de Pds5A o Pds5B produce letalidad embrionaria. **A.** Tabla resumen de las frecuencias de cada genotipo encontradas en la descendencia de cruces entre animales heterocigotos en distintos puntos del desarrollo embrionario. **B.** Ejemplos de embriones de 18,5 dpc de la misma camada control de los genotipos que se indican.

El estudio histológico de un embrión de 18,5dpc Pds5A-/- revela problemas de organogénesis muy acusados, que no se observan en tres embriones Pds5B-/- del mismo estadio (Figuras 15 y 16, respectivamente). El embrión Pds5A-/- presenta un retraso general del desarrollo, más acusado en el cerebro, donde se observa apoptosis generalizada y desarrollo cerebelar anómalo con patrón de laminillas alterado. El panículo adiposo es prácticamente inexistente, en particular la grasa parda retronucal, muy importante en esta etapa del desarrollo dada su función de termogénesis. Se aprecia una osificación tanto intramembranosa como endocondral incompleta, por ejemplo en vértebras y huesos largos, conservando zonas de cartílago que en ese punto del desarrollo deberían estar totalmente osificadas. Las capas de la piel muestran un fenotipo madurativo retrasado y su espesor es mucho menor que en embriones de genotipo salvaje del mismo estadio.

El estudio histopatológico de tres embriones Pds5B-/- también revela un retraso en el crecimiento que se manifiesta en un menor tamaño tanto de los embriones como de todos los órganos, así como una capa de grasa retronucal muy delgada (Figura 16). Sin embargo, ninguno de los fenotipos identificados parece suficientemente robusto como para justificar la letalidad embrionaria en este modelo.

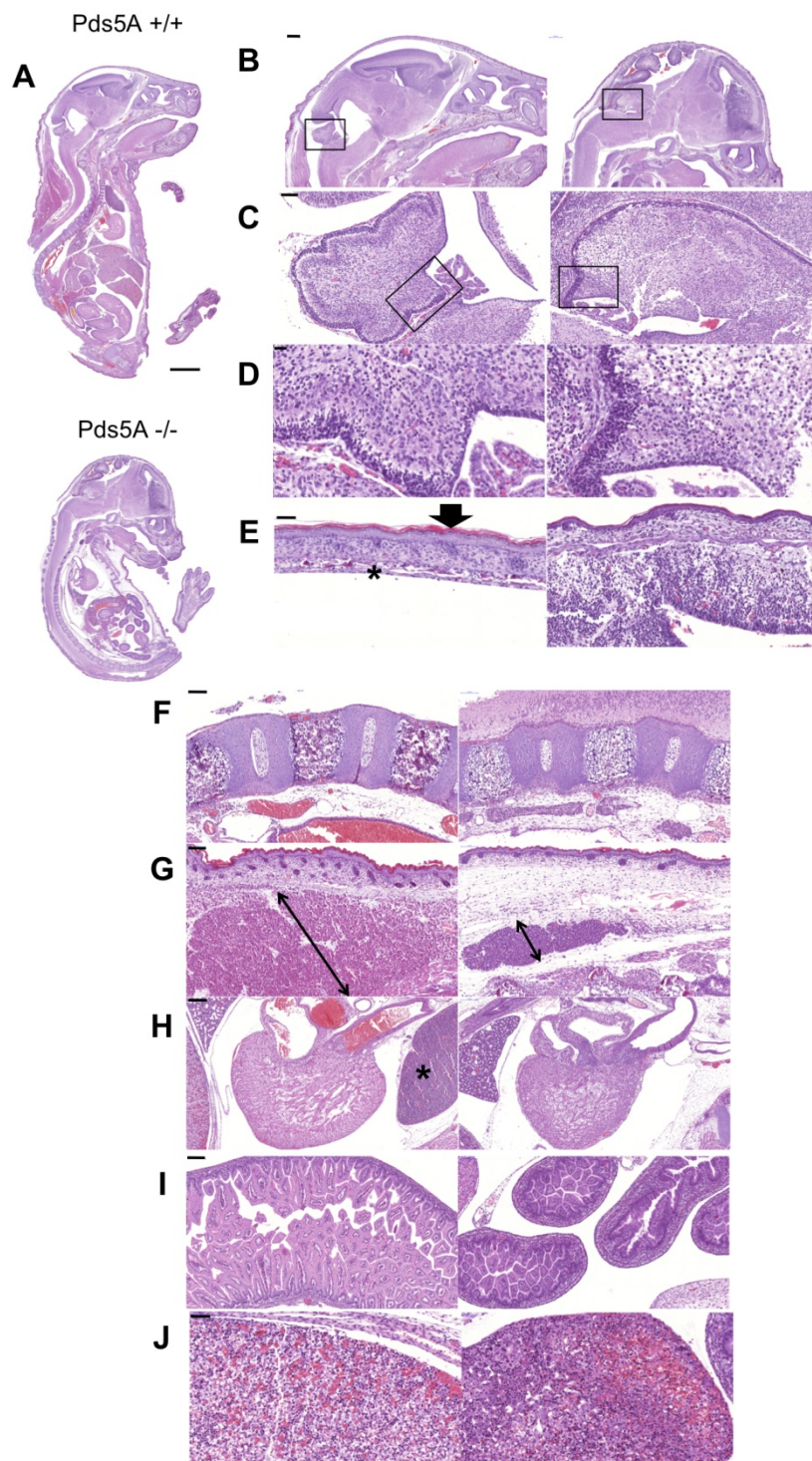


Figura 15. Los embriones Pds5A muestran retrasos evidentes en el desarrollo embrionario. **A.** Cortes sagitales de embriones de 18,5 dpc de genotipo salvaje (arriba) y Pds5A^{-/-} (abajo) teñidas con hematoxilina-eosina (H-E). **B a J:** panel izquierdo: control, derecho: Pds5A^{-/-}. **B.** Magnificación de la región del cerebro. **C.** Ampliación de la región del cerebelo. **D.** Magnificación de la base del cerebelo donde se aprecia el pobre desarrollo alcanzado en los embriones Pds5A^{-/-}. **E.** Detalle de la piel y hueso del cráneo. La capa de queratina se señala con una punta de flecha y la estrella marca la osificación de la calota del animal control, ausente en el animal Pds5A^{-/-}. **F.** Amplificaciones de una región comparable de la columna vertebral en las que se pueden apreciar el retraso en el proceso de osificación de los embriones Pds5A^{-/-}. **G.** Grasa parda retroocular. La flecha indica el espesor de dicha capa en ambos genotipos. **H.** Magnificación de la región del corazón. El timo, ausente en el embrión Pds5A^{-/-}, se señala con una estrella en el embrión control. **I.** Detalle del intestino delgado en el que se pueden apreciar las vellosidades. **J.** Secciones del hígado que muestran un incremento en apoptosis en el caso de Pds5A^{-/-}.

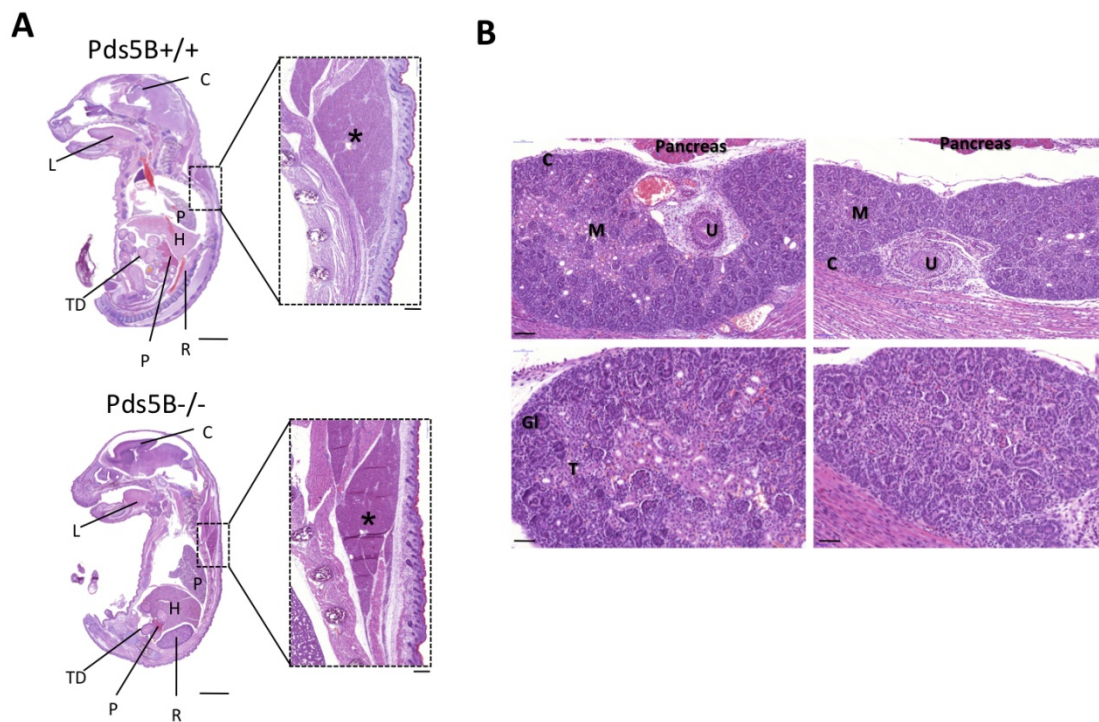


Figura 16. Los embriones *Pds5B* muestran retrasos evidentes en el desarrollo embrionario. **A.** Cortes sagitales de embriones de 18,5 dpc de genotipo salvaje y *Pds5B*^{-/-} teñidos con H-E en los que se aprecia la diferencia en tamaño y un menor desarrollo de la grasa parda retronuclear (marcada mediante asterisco) en ausencia de *Pds5B*. En los cortes se distinguen varias estructuras. Cerebro (C), lengua (L), pulmón (P), hígado (H), riñón (R), tubo digestivo (TD) y páncreas (P) entre otros. Barras de escala: embrión, 2 mm; magnificación grasa parda, 200µm. **B.** Cortes sagitales de riñón (izquierda: control, derecha: *Pds5B*^{-/-}), uno de los tejidos en los que mejor se observa el retraso en el desarrollo en ausencia de *Pds5B*, teñidos con H-E. Se distinguen la corteza (C), la médula (M) y la pelvis renal con uréter (U). A nivel cortical se observan glomérulos (Gl), más diferenciados en el caso del embrión control (panel izquierdo). Además, los embriones *Pds5B*^{+/+} presentan un mayor número de túbulo contorneados proximales y distales (T). Barra de escala: 100µm (panel superior); 50µm (panel inferior).

3. Efecto de la falta de función de *Pds5* en la progresión del ciclo celular

La letalidad embrionaria tardía de los animales deficientes en *Pds5A* o *Pds5B* permite obtener fibroblastos embrionarios primarios (MEFs, *mouse embryonic fibroblast*) con los que llevar a cabo un estudio detallado de los fenotipos celulares provocados por la ausencia de estas proteínas. En la mayor parte de los experimentos descritos a continuación, a no ser que se indique otra cosa, se han utilizado MEFs primarios obtenidos de embriones de 12,5 dpc y con un número de pases entre 2 y 4.

3.1 Capacidad proliferativa

El análisis por inmunoblot de extractos celulares totales preparados de MEFs muestra la total ausencia de las proteínas *Pds5A* y *Pds5B* en los embriones portadores del alelo nulo correspondiente en homocigosis (Figura 17A). La falta de *Pds5A* no tiene un efecto notable en los niveles de *Pds5B*, y viceversa, ni en los niveles de Cohesina (*Rad21*). Al analizar su capacidad proliferativa observamos que en las células carentes de *Pds5A* el crecimiento es

similar al de las células de genotipo salvaje (Figura 17B). En cambio, las células que carecen completamente de Pds5B crecen más despacio que las células control o con un alelo funcional de Pds5B (Figura 17C). La menor proliferación de las células deficientes en Pds5B no parece deberse a un bloqueo en una fase determinada del ciclo celular, según muestran los perfiles de citometría de flujo (FACS, Figura 17D).

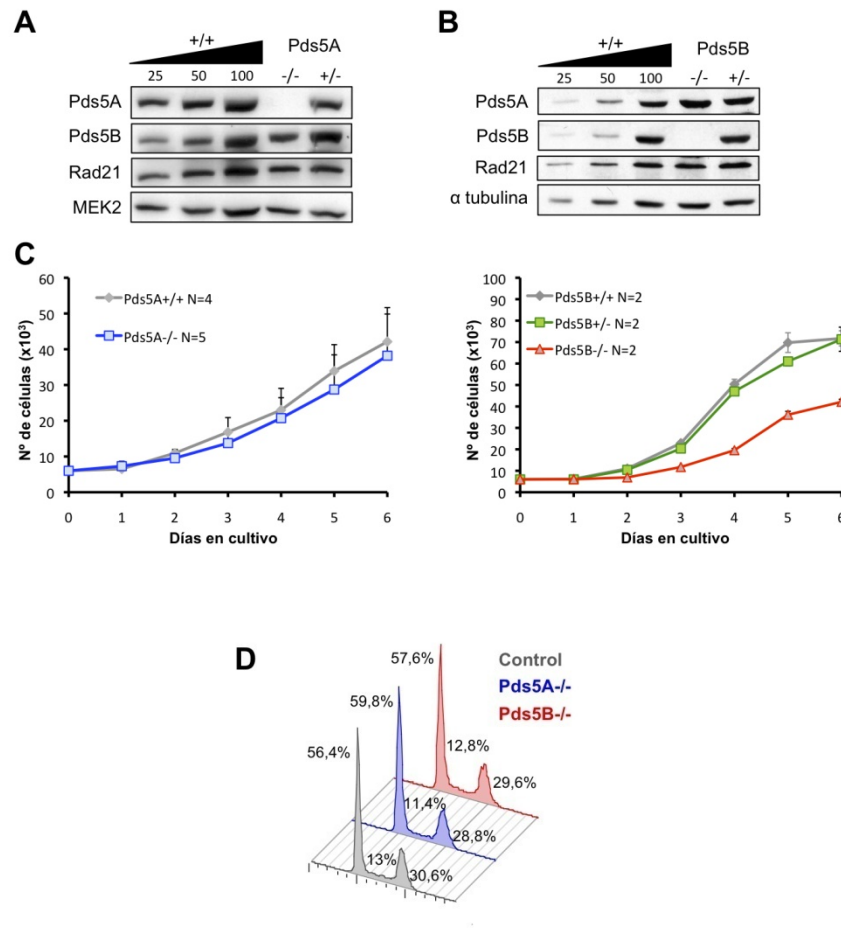


Figura 17. Proliferación celular en ausencia de Pds5A o Pds5B. **A y B.** Análisis por western blot de extractos totales preparados a partir de MEFs primarios (12,5 dpc) de los genotipos indicados. Los tres primeros carriles corresponden a cantidades crecientes del extracto de MEFs control (en porcentaje con respecto a la cantidad de extracto en los otros dos carriles). MEK2 y α tubulina se muestran como controles de carga. **C.** Curvas de crecimiento. Cada punto representa la media de los valores obtenidos para cada clon usado. N indica el número de clones. **D.** Análisis del ciclo celular de cultivos asincrónicos de MEFs de los tres genotipos mediante citometría de flujo. Los porcentajes corresponden a las células en G1, S y G2/M.

3.2 Progresión a través de la fase S

La cohesión se establece a la vez que se generan las cromátidas hermanas durante la fase S y requiere la acetilación de Smc3. Un estudio en células humanas sugiere que la presencia de Cohesina en cromatina dificulta el paso de la maquinaria replicativa y que una de las funciones de la acetilación es provocar un cambio conformacional en el anillo que desplaza de forma transitoria a Pds5-Wapl para permitir el paso de la horquilla (Terret et al., 2009). En ese estudio, los defectos en la progresión de la horquilla replicativa observados en células

carentes de las acetiltransferasas Esco1 o Esco2 se rescatan mediante la eliminación de Wapl o de Pds5A. Para estudiar si la falta de Pds5A o Pds5B afecta de forma específica a la progresión a través de la fase S, se dio un pulso de BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) de 40 minutos a cultivos de células asincrónicas y a continuación se analizó mediante FACS e inmunofluorescencia el porcentaje de células en las que podía verse incorporación de dicho análogo. No se detectaron diferencias significativas entre las células de los tres genotipos (Fig. 18A). Una clasificación de los patrones observados en la tinción con BrdU entre una distribución homogénea de la señal (característico de fase S temprana) o en focos (fase S tardía) tampoco permite apreciar diferencias entre las células control y las células deficientes en una u otra proteína Pds5 (Figura 18B).

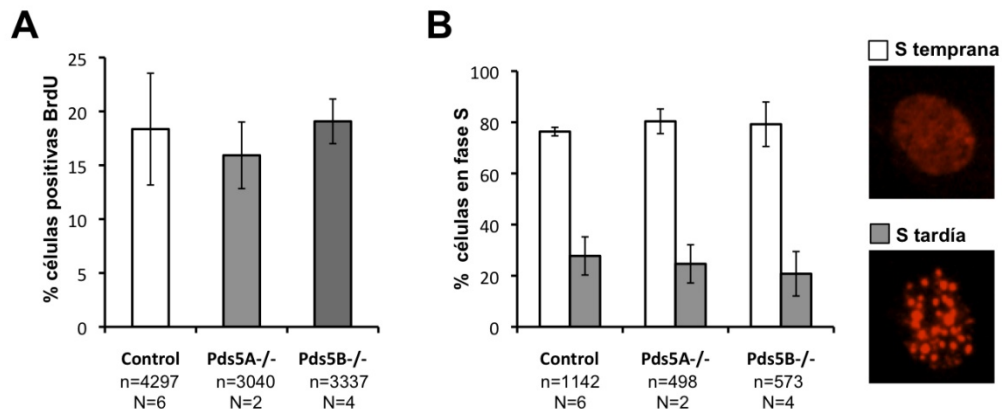


Figura 18. Progresión a través de fase S en ausencia de Pds5A o Pds5B. **A.** Cuantificación del número de células positivas para BrdU tras un pulso de 40 minutos en cultivos asincrónicos de MEFs primarios. **B.** Cuantificación del porcentaje de células en fase S temprana o tardía en función del patrón de tinción con BrdU que se indica en los paneles de la derecha. Se muestran las medias y desviaciones estándar. N es el número de clones y n es el número total de células analizadas.

4. La falta de Pds5 aumenta la cantidad de Cohesina en la cromatina interfásica pero no afecta a la disociación en profase

Pds5 se define a menudo como un factor que modula la asociación de Cohesina a cromatina si bien no está implicado en su carga en cromatina *per se*. En células humanas tratadas con siARN (del inglés, *small interfering RNA*) contra una u otra proteína no se observan diferencias en la asociación global de Cohesina a cromatina (Losada et al., 2005). Estos experimentos, a pesar de conseguir una reducción considerable de las proteínas Pds5, no las eliminan por completo, de modo que la cantidad residual de Pds5 puede ser suficiente para llevar a cabo su función. En cambio, nuestros MEFs carecen por completo de Pds5A o Pds5B. Mediante fraccionamiento bioquímico de células asincrónicas observamos que la mayor parte

de la Cohesina y de Pds5 presente en el extracto total se encuentra unida a cromatina, tanto en células de genotipo salvaje como deficientes en Pds5A o Pds5B (Figura 19A). La fracción de Pds5A unida a cromatina no parece significativamente mayor en células carentes de Pds5B, ni viceversa. Tampoco apreciamos cambios significativos en la cantidad de Cohesina total (Rad21) ni Cohesina-SA1 o Cohesina-SA2 presente en cromatina. Esto confirma que no hay una especificidad de interacción de una u otra Cohesina con una u otra proteína Pds5.

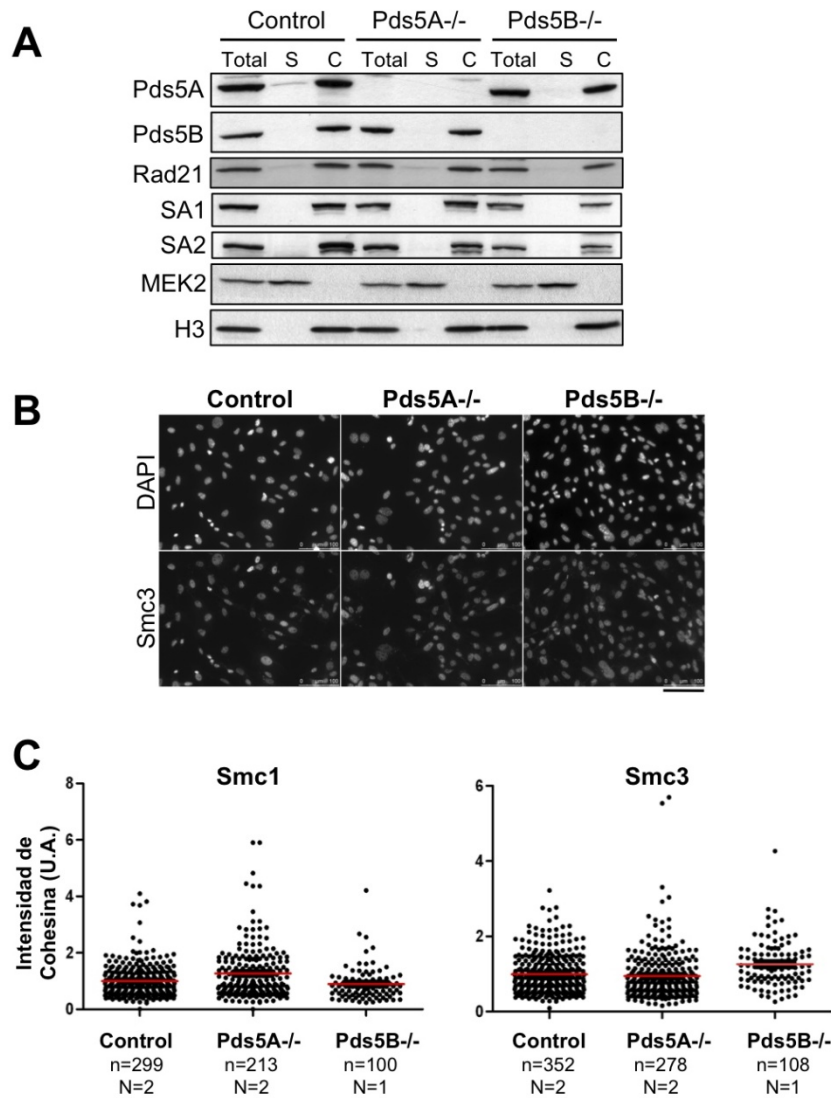


Figura 19. La asociación de Cohesina a cromatina no se afecta en ausencia de Pds5A o Pds5B **A.** Análisis mediante western blot del muestras de fibroblastos primarios sometidos a un fraccionamiento bioquímico. Se cargaron cantidades equivalentes de extracto total, fracción soluble (S) y fracción unida a cromatina (C). Como controles de carga y del fraccionamiento se usaron MEK2, una proteína citoplasmática, y la histona H3, presente casi exclusivamente en cromatina. **B.** Tinciones de inmunofluorescencia de la subunidad de Cohesina Smc3 en cultivos asincrónicos de MEFs control, Pds5A^{-/-}, Pds5B^{-/-}. Las células se trataron con detergente antes de la fijación para eliminar la fracción soluble. El experimento se repitió con anticuerpos que reconocen Smc1 (no mostrado). Barra de escala: 100µm. **C.** Cuantificación de las señales de inmunofluorescencia obtenidas en **(B)** y en las inmunofluorescencias (no mostradas) de Smc1. U.A.: unidades arbitrarias. N, número de clones; n, número de interfases medidas. Las diferencias que se observan entre los distintos genotipos no son significativas.

Se obtienen resultados similares al medir la abundancia de Cohesina unida a cromatina mediante inmunofluorescencia. A fin de eliminar la proteína soluble y medir sólo la asociada a cromatina, las células se trataron con detergente antes de su fijación (tratamiento de preextracción, ver Materiales y Métodos, apartado 2.11). A continuación se tiñeron con anticuerpos que reconocen específicamente a las subunidades Smc1 y Smc3 de la Cohesina (Figura 19B y datos no mostrados). La cuantificación de dichas tinciones no revela diferencias significativas entre las células de los distintos genotipos (Figura 19C). Sin embargo, cuando se reduce de forma simultánea la presencia de ambas proteínas Pds5 -utilizando un siARN contra Pds5A [siPds5A] en MEFs deficientes para Pds5B o contra Pds5B [siPds5B] en MEFs deficientes en Pds5A (Figura 20A) - se observa un aumento, moderado pero significativo en la cantidad de Cohesina en la cromatina interfásica (Figura 20B y C). Así pues, parece existir un límite en la cantidad de Pds5 presente en la célula por debajo del cual es posible observar alteraciones en la asociación global de Cohesina a la cromatina. Sin embargo, no encontramos un requerimiento específico de Pds5A o Pds5B, al menos usando estas técnicas. Esperamos que en el futuro el uso de experimentos de FRAP nos permita observar el efecto de las proteínas Pds5 en el comportamiento dinámico de la Cohesina.

En extractos de huevos de *Xenopus laevis* se ha descrito un defecto claro en la disociación de Cohesina en profase tras la eliminación simultánea de Pds5A y Pds5B (Losada et al., 2005). En este modelo experimental, el efecto de la eliminación de Pds5 es tan notorio como el efecto de la eliminación de Wapl (Shintomi and Hirano, 2009). No ocurre lo mismo en células de ratón. Si fijamos nuestra atención en las células mitóticas presentes en las tinciones de inmunofluorescencia mencionadas en el párrafo anterior, no observamos un aumento en la intensidad de Cohesina en los cromosomas metafásicos carentes de Pds5 (Figura 20D). En cambio, experimentos similares con MEFs carentes de Wapl sí evidencian un defecto agudo en la disociación de Cohesinas en profase (Tedeschi, 2010). Estos resultados ponen de manifiesto que, al menos en células somáticas, las acciones de Wapl y Pds5 sobre la Cohesina no son en absoluto equivalentes.

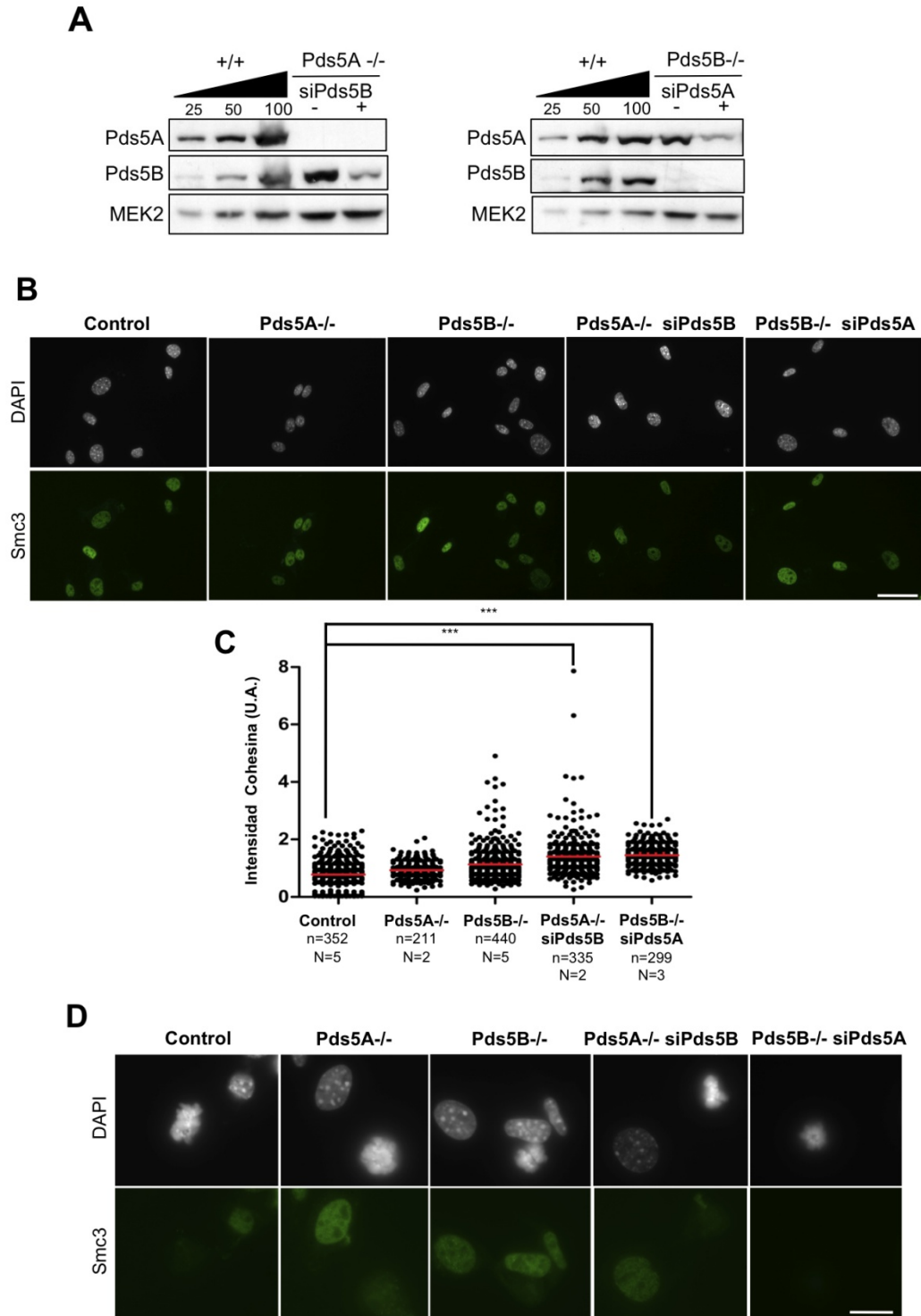


Figura 20. Comportamiento de la Cohesina en ausencia de las dos proteínas Pds5. **A.** Análisis por western blot de extractos totales de MEFs primarios del genotipo indicado tratados con siARN contra Pds5B (siPds5B) o Pds5A (siPds5A). Los tres primeros carriles corresponden a cantidades crecientes del extracto de MEFs control (en porcentaje con respecto a la cantidad de extracto en los otros carriles). MEK2 se muestra como control de carga. **B.** Microscopía de fluorescencia en cultivos asincrónicos de MEFs primarios tratados con los siARN que se indican con anticuerpos que reconocen Smc3. Las células se trataron con detergente antes de la fijación para ver solo la población unida a cromatina. Barra de escala: 50 μ m. **C.** Cuantificación de las señales de inmunofluorescencia obtenidas en (B) en células en interfase. U.A., unidades arbitrarias. N, número de clones; n, número de células analizadas. ***, $p < 0.001$. **D.** Microscopía de fluorescencia de Smc3 en mitosis de los genotipos indicados. Las células se trataron con detergente antes de la fijación para ver solo la población unida a cromatina. Barra de escala: 20 μ m.

5. Comportamiento de los factores de cohesión Wapl y Sororina en ausencia de Pds5

En la Introducción se describe cómo Pds5 parece actuar como una plataforma que facilita la interacción de Wapl y Sororina con la Cohesina. En tanto que Wapl-Pds5 desestabilizan la asociación de Cohesina a la cromatina, la interacción de Sororina-Pds5, al desplazar a Wapl, crearía una Cohesina estable. Sin embargo, Pds5 no es indispensable para la unión de Wapl a la Cohesina en cromatina, al menos en *Xenopus* (Shintomi and Hirano, 2009). En MEFs deficientes en Pds5A o Pds5B tampoco hay cambios apreciables en la asociación de Wapl con la cromatina, al menos por tinción de inmunofluorescencia (Figura 21). Queda por comprobar qué ocurre cuando las dos proteínas Pds5 se eliminan simultáneamente.

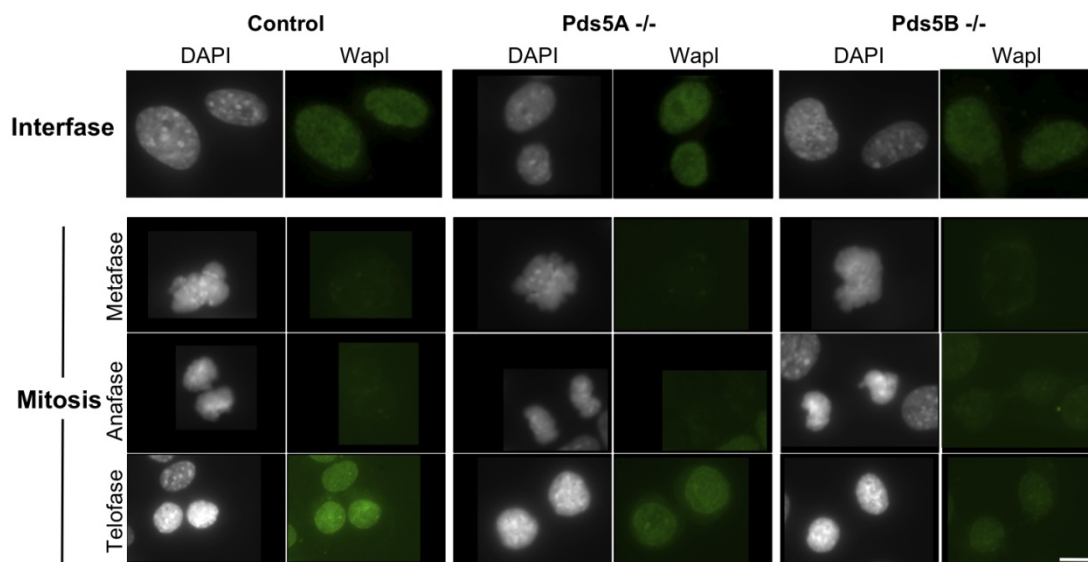


Figura 21. Comportamiento de la Wapl en ausencia de Pds5A o Pds5B. Microscopía de fluorescencia de MEFs primarios control, Pds5A^{-/-}, Pds5B^{-/-} con un anticuerpo que reconoce Wapl tanto en interfase (panel superior) como en distintas fases de mitosis (paneles inferiores). Las células se trataron con detergente antes de la fijación. Barra de escala: 20 μ m.

En cuanto a Sororina, se ha descrito que se une a cromatina a medida que avanza la replicación debido, al menos en parte, a que la acetilación de Cohesina facilita la interacción con esta proteína. Este factor, esencial para la cohesión, permanece en cromatina durante G2 y se disocia en dos pasos durante mitosis, como ocurre con la Cohesina: la gran mayoría se elimina durante profase y una pequeña cantidad queda retenida en la región centromérica hasta anafase (Nishiyama et al., 2010). En fraccionamientos de cromatina de cultivos asincrónicos de MEFs observamos pocas diferencias en la asociación de Sororina a cromatina

en ausencia de Pds5A o Pds5B (Figura 22). Sin embargo, al reducir las dos empleando siARN de Pds5A en los MEFs deficientes en Pds5B sí pudimos obtener una disminución muy clara en la cantidad de Sororina en cromatina. Este resultado indica que, a diferencia de Wapl, la asociación de Sororina a cromatina sí depende de Pds5 en células somáticas de ratón, al igual que ocurre en *Xenopus* (Nishiyama et al., 2010).

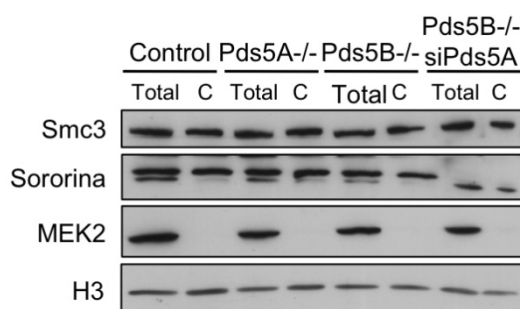


Figura 22. La unión de Sororin a cromatina depende de Pds5. Análisis por western blot de extractos totales y de fracciones de cromatina (C) de cultivos asincrónicos de MEFs control, Pds5A^{-/-}, Pds5B^{-/-} y Pds5B^{-/-} tratados con un siARN de Pds5A (siPds5A). Como controles de carga y del fraccionamiento se muestran MEK2 (proteína soluble) y H3 (componente de la cromatina).

Un trabajo reciente describe que Pds5 es necesario para la acetilación de Smc3 en la levadura *S. pombe* (Vaur et al., 2012). Anteriormente se había detectado una interacción entre Pds5 y Eso1, la acetiltransferasa de Cohesina (Tanaka et al., 2001). Al analizar los niveles de Smc3 acetilado en la cromatina de MEFs deficientes en Pds5A y Pds5B observamos una reducción parcial, lo que sugiere que las proteínas Pds5 facilitan la acetilación de Cohesina también en células de mamífero (Figura 23).

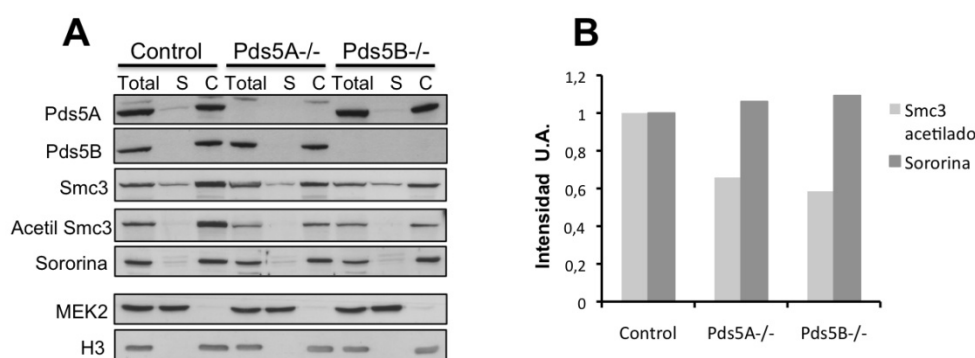


Figura 23. La acetilación de Smc3 dependen de las proteínas Pds5. Fraccionamiento bioquímico de fibroblastos primarios control, Pds5B^{-/-} y Pds5A^{-/-}. Se muestran los niveles totales, solubles (S) y unidos a cromatina (C) de la Cohesina Smc3, su versión acetilada (Acetil Smc3) y Sororina. MEK2 y H3 se muestran como controles de las fracciones soluble y unida a cromatina, respectivamente. **B.** Cuantificación de las señales del blot que se muestra en **(A)** para Smc3 acetilado (normalizado por la señal de Smc3) y de Sororina (normalizado por la señal de H3) en las fracciones de cromatina.

Puesto que la cantidad de Sororina en cromatina no se modifica en estas condiciones, se concluye que en células existe un exceso de complejos de Cohesina acetilados con respecto a los que llevan asociada Sororina. Por otro lado, en inmunoprecipitaciones de las proteínas Pds5 de extractos nucleares de células HeLa pudimos ver que tanto Pds5A como Pds5B interaccionan con Cohesinas que tienen la subunidad Smc3 acetilada y con Sororina (Figura 24). También parece haber una pequeña cantidad de Esco2 en los inmunoprecipitados de Smc3, Pds5A, Pds5B y Sororina. Este resultado sugiere que no existe una preferencia clara entre una proteína Pds5 (A o B) y una acetil transferasa (Esco1 o Esco2). Sin embargo, experimentos que se describen en la siguiente sección revelan que Pds5B se requiere específicamente en la heterocromatina pericentromérica y, por otro lado, el análisis de un modelo de ratón deficiente en Esco2 propone que esta acetiltransferasa es la principal responsable de la acetilación de Smc3 en la región pericentromérica (Whelan et al., 2012).

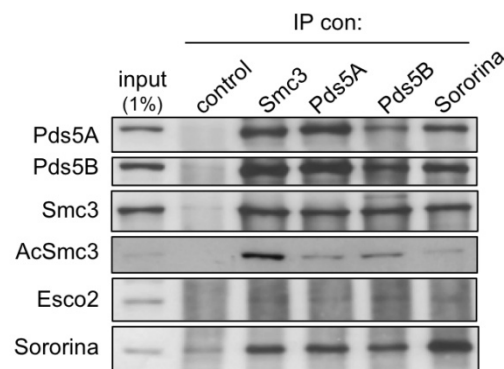


Figura 24. Pds5A y Pds5B interaccionan con Cohesina acetilada. Análisis por western blot de los inmunoprecipitados obtenidos a partir de un extracto nuclear de células HeLa, enriquecido en cromatina, con los anticuerpos indicados. En el primer carril se ha cargado una fracción del extracto de partida. IP, inmunoprecipitación.

6. Pds5A y Pds5B tienen funciones no redundantes en el mantenimiento de la cohesión en distintas regiones cromosómicas

6.1 Pds5A tiene un papel predominante en la cohesión de los telómeros y brazos cromosómicos

Para analizar si la falta de las proteínas Pds5 tiene consecuencias negativas en la cohesión de las cromátidas hermanas utilizamos varias técnicas diferentes. La cohesión centromérica se evalúa normalmente en mitosis mediante esparcidos de cromosomas metafásicos (*metaphase spreads*) en tanto que es preferible analizar la cohesión de brazos y telómeros en interfase. Esto se debe a que en cromosomas metafásicos la cohesión se mantiene sobre todo en el centrómero, pero se pierde progresivamente del resto del cromosoma al disociarse de la cromatina la mayor parte de las Cohesinas. Para medir la cohesión en interfase se utiliza hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (*FISH, Fluorescence In Situ Hybridization*) correspondientes a regiones subteloméricas o de alguna región del brazo. La sonda detecta una señal por cada cromosoma homólogo en células que bien no han replicado aún o que, habiendo replicado, mantienen las dos cromátidas muy juntas gracias a la cohesión. En cambio, la falta de cohesión se pone de manifiesto al observarse un doblete en uno o ambos homólogos (Remeseiro et al., 2012).

En nuestro caso empleamos sondas que hibridan en el subtelómero y el brazo del cromosoma 10 (Figura 25A; ver también Materiales y Métodos, apartado 2.7). En la Figura 25B se muestran ejemplos de los núcleos tras la hibridación y su clasificación. El análisis con la sonda subtelomérica revela que la falta de Pds5A produce un aumento considerable en el porcentaje de células con dobletes (de 17% en MEFs de genotipo salvaje a 55% en MEFs deficientes en Pds5A y 45% en MEFs tratados con siARN de Pds5A; Figura 25C). La falta de Pds5B tiene un efecto menor (30% de células muestran dobletes) y aunque reduzcamos los niveles de Pds5A en estas células mediante siARN, la magnitud de los defectos no sobrepasa los observados en células a las que sólo les falta Pds5A. Estos resultados evidencian un papel prominente de Pds5A en la cohesión telomérica.

En las hibridaciones con la sonda del brazo del cromosoma 10 también se observa aumento, si bien menos pronunciado, en el porcentaje de células con dobletes al faltar Pds5A (de 20% en MEFs de genotipo salvaje a 45% en MEFs deficientes en Pds5A y 36% en MEFs tratados con siARN de Pds5A; Figura 25D). En células deficientes en Pds5B, sin embargo, los defectos de cohesión no son mayores que en células control y sólo si se tratan con siARNs contra Pds5A se observan defectos de magnitud muy similar a los que produce el siARN en

MEFs de genotipo salvaje. Así pues, al menos en esta región del brazo del cromosoma 10, la cohesión está mediada fundamentalmente por Cohesinas asociadas a Pds5A.

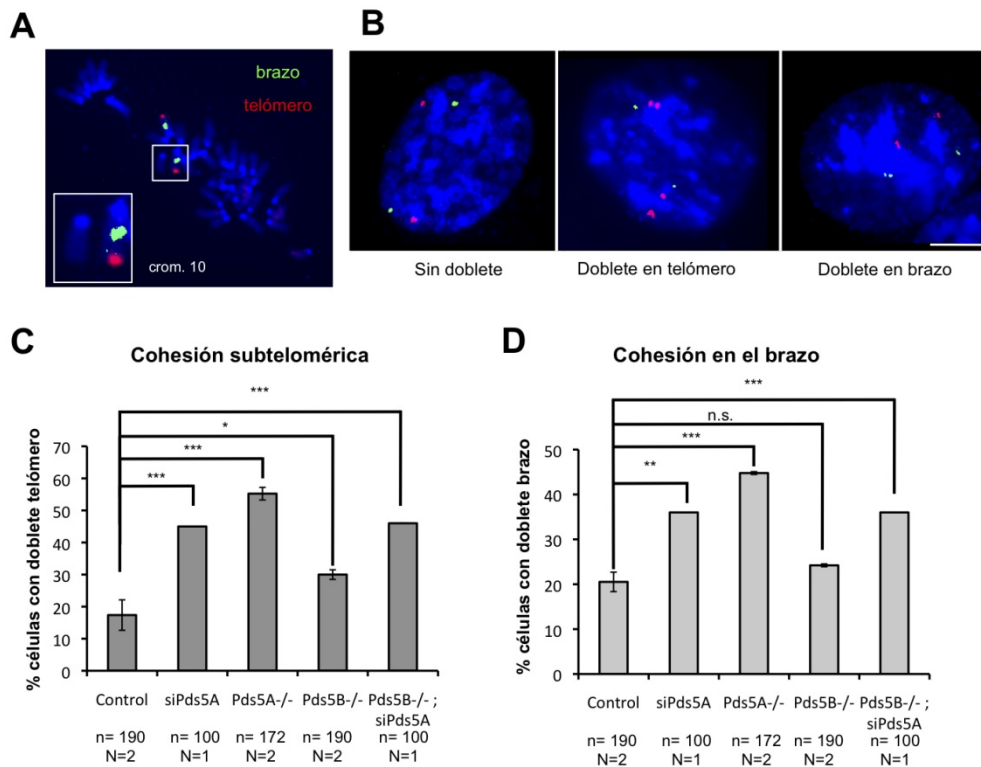


Figura 25. Defectos de cohesión visualizados mediante FISH en interfase. Imagen representativa de una metafase en fibroblastos inmortalizados que muestra la especificidad de las sondas usadas empleadas para examinar la cohesión en brazos y telómeros. Las sondas hibridan en la región del brazo (verde) y en el telómero del brazo largo (rojo) del cromosoma 10. Barra de escala: 10µm **B.** Ejemplos núcleos interfásicos teñidos con DAPI (azul) y las sondas que se indican en **(A)**. La presencia de un doblete evidencia un defecto de cohesión. **C y D.** Cuantificación del número de células interfásicas con defectos en cohesión en el telómero y el brazo. N, número de experimentos; n, número de células analizadas. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$, n.s., $p > 0.05$)

La fase G2 del ciclo celular es el momento en el que se reparan los DSBs que se producen durante la replicación del ADN. La Cohesina facilita la reparación de dicho daño manteniendo las cromátidas hermanas juntas de forma que la cromátida intacta pueda servir como molde para la reparación fidedigna de la dañada mediante recombinación homóloga. El tratamiento con bajas dosis de afidicolina, un inhibidor de la replicación del ADN que actúa bloqueando las ADN polimerasas replicativas, produce problemas de replicación de los denominados sitios frágiles. Se piensa que estos sitios corresponden a regiones de por sí difíciles de replicar presentes a lo largo de los cromosomas y en presencia de afidicolina generan colapso de horquillas y/o DSBs que se reparan por recombinación homóloga (Rothkamm et al., 2003). En caso de que la célula progrese a mitosis sin completar su replicación o sin reparar el daño, éstos sitios frágiles se visualizan como roturas en los cromosomas condensados (Figura 26A). Las hibridaciones en interfase descritas en el apartado anterior nos permitieron ver lo que sucede con la cohesión en un punto determinado de un

brazo cromosómico. Sin embargo, para estudiar de forma más global la cohesión a lo largo de los brazos resulta útil evaluar el número de roturas en cromosomas mitóticos tras tratar las células con 0,5 μ M afidicolina durante 24 h. Sólo en el caso de células sin Pds5A se observa un número apreciable de roturas incluso en células sin tratar, en tanto que el tratamiento con afidicolina aumenta la cantidad de roturas en todos los genotipos (Figura 26B). La cuantía de las roturas en esta condición es similar en ausencia de Pds5A o Pds5B, y mayor que en células de genotipo salvaje, mientras que la falta simultánea de ambas proteínas Pds5 produce un incremento que va más allá de la suma de los defectos en ausencia de una u otra. Estos resultados hacen pensar que si bien las dos proteínas Pds5 contribuyen a mantener la cohesión a lo largo de los brazos cromosómicos, Pds5A tiene un papel más relevante.

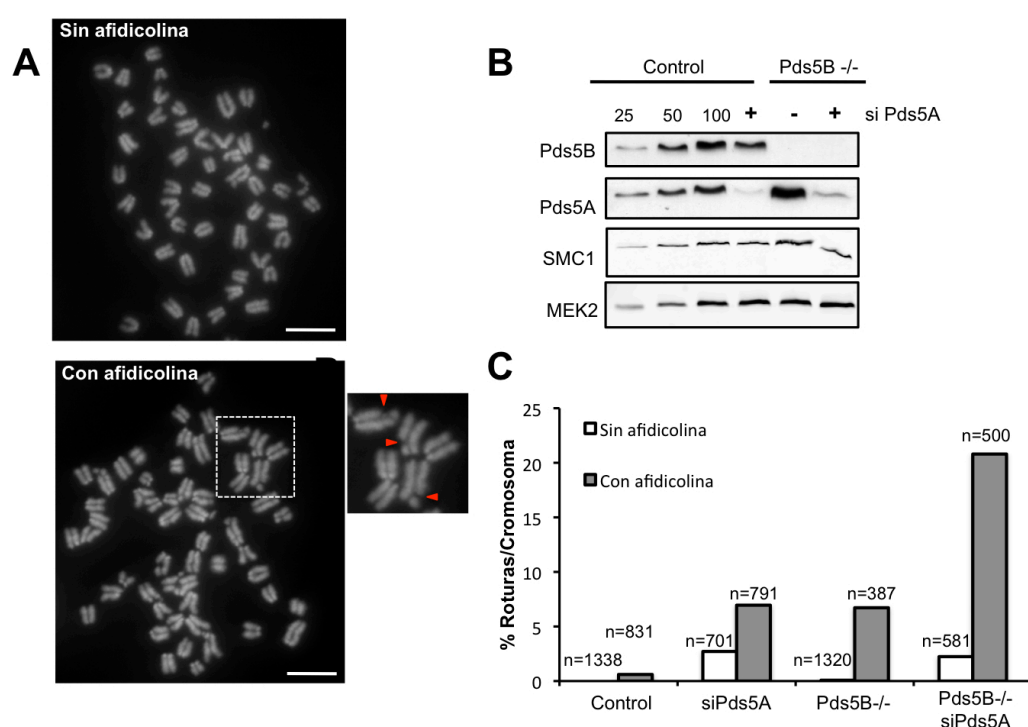


Figura 26. Pds5A y Pds5B contribuyen a la cohesión de los brazos pero Pds5A tiene un papel más relevante.

A. Imágenes representativas de esparcidos cromosómicos preparados de MEFs sin tratar o tratados con afidicolina. Las cabezas de flecha rojas señalan roturas en los cromosomas. Barra de escala: 10 μ m. **B.** Análisis mediante western blot de los niveles de bajada de Pds5A tras la interferencia con el siARN. MEK2 se usó como control de carga. **C.** Cuantificación del número de roturas por cada 100 cromosomas en las metafases de los genotipos indicados. El número de cromosomas (n) aparece encima de cada barra.

6.2 Pds5B es crítico para la cohesión centromérica

Para evaluar la cohesión centromérica se prepararon esparcidos cromosómicos de los MEFs de todos los genotipos. Las metafases observadas presentaron fenotipos que se clasificaron en tres grupos: (1) todos los cromosomas de la metafase presentan una cohesión centromérica robusta (sin defecto); (2) entre uno y cuatro cromosomas de la metafase tiene los centrómeros claramente separados (defecto moderado); (3) cinco o más cromosomas con

los centrómeros separados (defecto severo). En la Figura 27A pueden verse ejemplos de cada fenotipo. Es importante señalar que para este análisis excluimos aquellas metafases en las que todos los cromosomas aparecían completamente separados, es decir, en las que sólo podíamos identificar cromátidas sueltas, a fin de evitar contar anafases como defectos de cohesión. Si bien los MEFs se trataron con colcemida durante 4 horas para enriquecer la población de células mitóticas, se sabe que estas células presentan un punto de control de mitosis (SAC) débil que permite a algunas células progresar a anafase aun en ausencia del huso mitótico.

Observamos que la eliminación de Pds5A, bien total en MEFs *knock out*, bien mediante siARN, no produce defectos de cohesión mayores que los de las células control (Figura 27B). En cambio, la ausencia de Pds5B da lugar a un defecto de cohesión centromérica muy claro. Más del 60% de las metafases analizadas presentan un defecto severo y un 15% adicional un defecto moderado. Así, menos del 25% de las metafases son normales, frente al 85% de las células de genotipo salvaje o carentes de Pds5A. La eliminación de Pds5A (mediante siARN) en los MEFs deficientes en Pds5B no incrementa los defectos de cohesión centroméricos si bien aumenta el número de metafases con las cromátidas totalmente separadas (datos no mostrados).

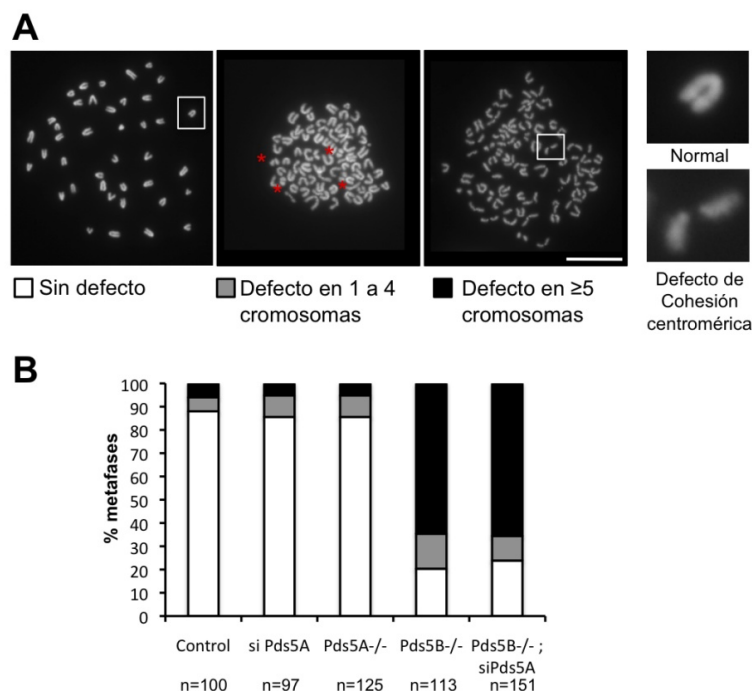


Figura 27. La cohesión centromérica está mediada específicamente por Pds5B. Esparcidos de cromosomas metafásicos preparados a partir de MEFs tratados durante 4h con colcemida. Se muestran ejemplos representativos de los fenotipos de cohesión centromérica cuantificados en B: sin defecto, con defecto en 1 a 4 cromosomas (señalados con asterisco rojo) y defecto en ≥ 5 cromosomas (en la foto, todos los cromosomas tienen problemas de cohesión centromérica). A la derecha se muestran las magnificaciones de un cromosoma normal y otro con defecto de cohesión centromérica. Barra de escala: 20µm. **B.** Cuantificación de los defectos observados en MEFs de los genotipos indicados, tratados o no con siARN. Se indica el número de metafases analizadas en cada condición (n).

Se ha descrito que en células que pasan mucho tiempo arrestadas en metafase se produce el efecto denominado “*cohesión fatigada*”, este fenómeno consiste en el desgaste progresivo de la cohesión y finalmente da lugar a la separación de las cromátidas hermanas de forma independiente de la ruta de Separasa (Daum et al., 2011). Hemos comprobado que el defecto de cohesión observado a nivel centromérico en células Pds5B nulas no es producto de ese fenómeno, ya que, en metafases de células no tratadas, observamos un defecto muy similar al encontrado en las células tratadas con colcemida (Figura 28).

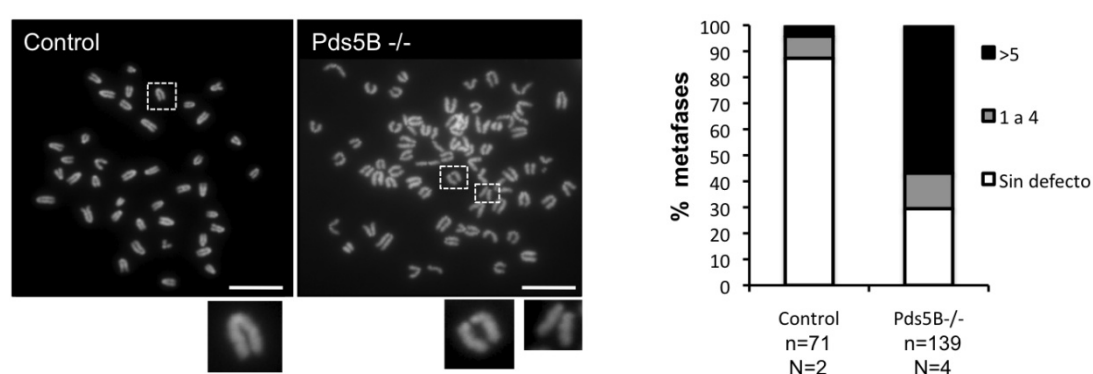


Figura 28. Cohesión centromérica en células no tratadas con colcemida. Imágenes representativas y cuantificación de los defectos de cohesión centromérica (descritos en la Figura 27) observados en esparcidos cromosómicos preparados a partir de MEFs con y sin Pds5B no tratados con colcemida. N, número de clones; n, número de metafases analizadas. Barra de escala: 20µm

Para comprobar si los defectos de cohesión centromérica detectados en los MEFs en cultivo podían observarse también en células obtenidas directamente de algún tejido embrionario se extirparon hígados de embriones 14,5dpc de genotipo salvaje, Pds5A *knock out* y Pds5B *knock out*. Tras una breve incubación con colcemida, se prepararon esparcidos cromosómicos de los hepatocitos (detallado en Materiales y Métodos, apartado 2.8). El análisis que se muestra en la Figura 29 confirma lo observado en células en cultivo. Mientras que en ausencia de Pds5A la cohesión centromérica es robusta, en ausencia de Pds5B está muy afectada. Los defectos de cohesión observados en los hepatocitos son de magnitud similar a los obtenidos en los fibroblastos. Estos resultados demuestran claramente que Pds5B está involucrado específicamente en la cohesión de la región centromérica y que Pds5A no es capaz de llevar a cabo esta función.

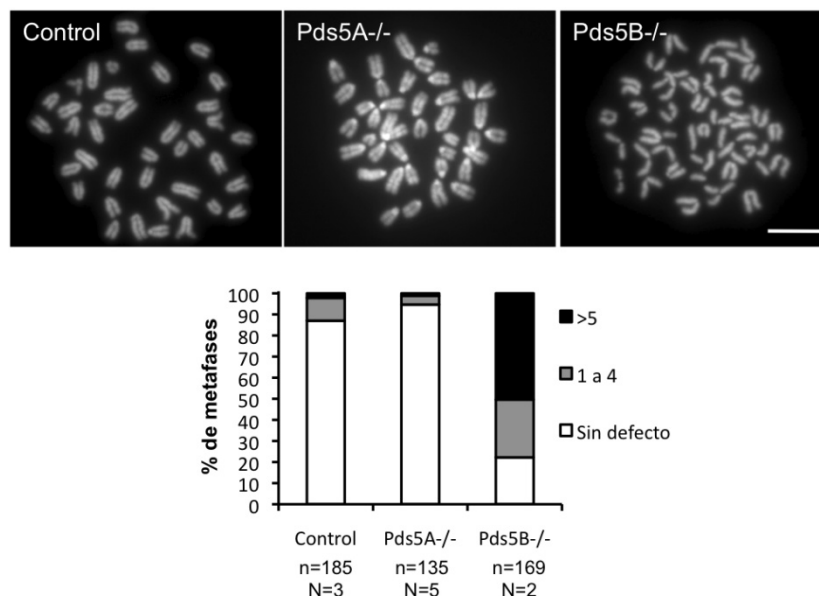


Figura 29. Defectos de cohesión centromérica en células aisladas directamente de embriones. Imágenes representativas y cuantificación de los defectos de cohesión centromérica (descritos en la Figura 27) observados en esparcidos cromosómicos de hepatocitos fetales aislados de embriones 14,5 dpc. N, número de clones; n, número de metafases analizadas. Barra de escala: 10 μ m.

6.3 La Cohesina centromérica no es cohesiva si no está Pds5B

Se ha descrito que la acetiltransferasa Esco2 se acumula en la heterocromatina pericentromérica cuando ésta se replica al final de fase S (Whelan et al., 2011). Puesto que nuestros resultados habían mostrado que las proteínas Pds5 con necesarias para la acetilación de Smc3, decidimos analizar la localización de Esco2 en células deficientes en Pds5A y Pds5B que se encuentran en este momento del ciclo. Para ello combinamos la tinción de Esco2 con la de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) pues este factor se acumula alrededor de los focos de heterocromatina pericentromérica mientras se está replicando produciendo un patrón característico en forma de herradura. En estas inmunofluorescencias observamos que en un 50% de las células sin Pds5B no se podía distinguir una acumulación de Esco2 en la región pericentromérica (Figura 30), en tanto que este fenotipo era mucho menos notorio en los MEFs sin Pds5A (20%) y muy poco frecuente (5%) en células control.

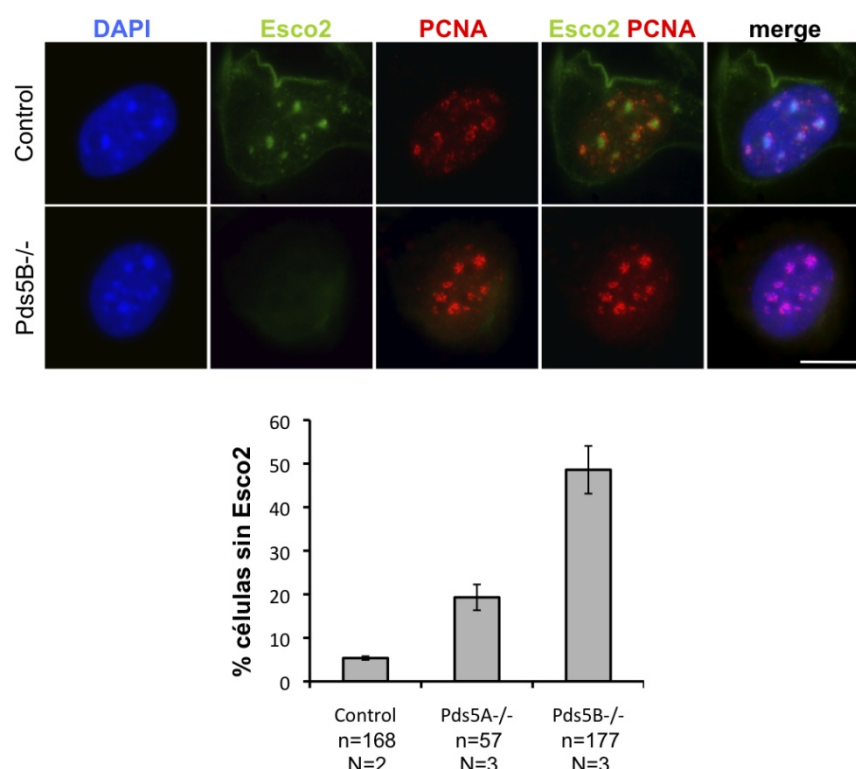


Figura 30. Menor presencia de Esco2 en la heterocromatina de células deficientes en Pds5B. Imágenes representativas de fibroblastos primarios teñidos con anticuerpos contra PCNA y Esco2. En el panel de la superior se puede ver la acumulación de Esco2 (verde) en los focos de heterocromatina que se están replicando, marcados con PCNA (rojo) y que se tiñen más intensamente con DAPI (azul). En las células Pds5B-/- es frecuente no observar tinción de Esco2 en estos focos heterocromatina que se están replicando (panel inferior). En la gráfica se muestra la cuantificación de este fenotipo en MEFs control, Pds5A-/- y Pds5B-/- . N, número de clones; n, número de interfases en fase S tardía analizadas. Barra de escala: 10 μ m.

El anticuerpo de que reconoce Smc3 acetilado no funciona en inmunofluorescencia, pero si hacemos tinciones con Sororina y nos fijamos en la células en G2 (en las que Aurora B se acumula preferentemente en los focos de heterocromatina) podemos observar también células deficientes en Pds5B en las que no hay Sororina en dichos focos (Figura 31A). Es más, si repetimos la tinción de Sororina en cromosomas metafásicos preparados mediante citospin observamos también la falta de acumulación de Sororina en la región entre centrómeros hermanos, en tanto que sí aparece en células control o carentes de Pds5A (Figura 31B). Así, es posible que la falta de Pds5B dificulte la acetilación de Cohesinas en la región pericentromérica, mediada principalmente por Esco2, y esto a su vez impida la asociación de Sororina. De este modo, la Cohesina pericentromérica no es cohesiva en las células sin Pds5B, lo que explicaría los defectos de cohesión centromérica.

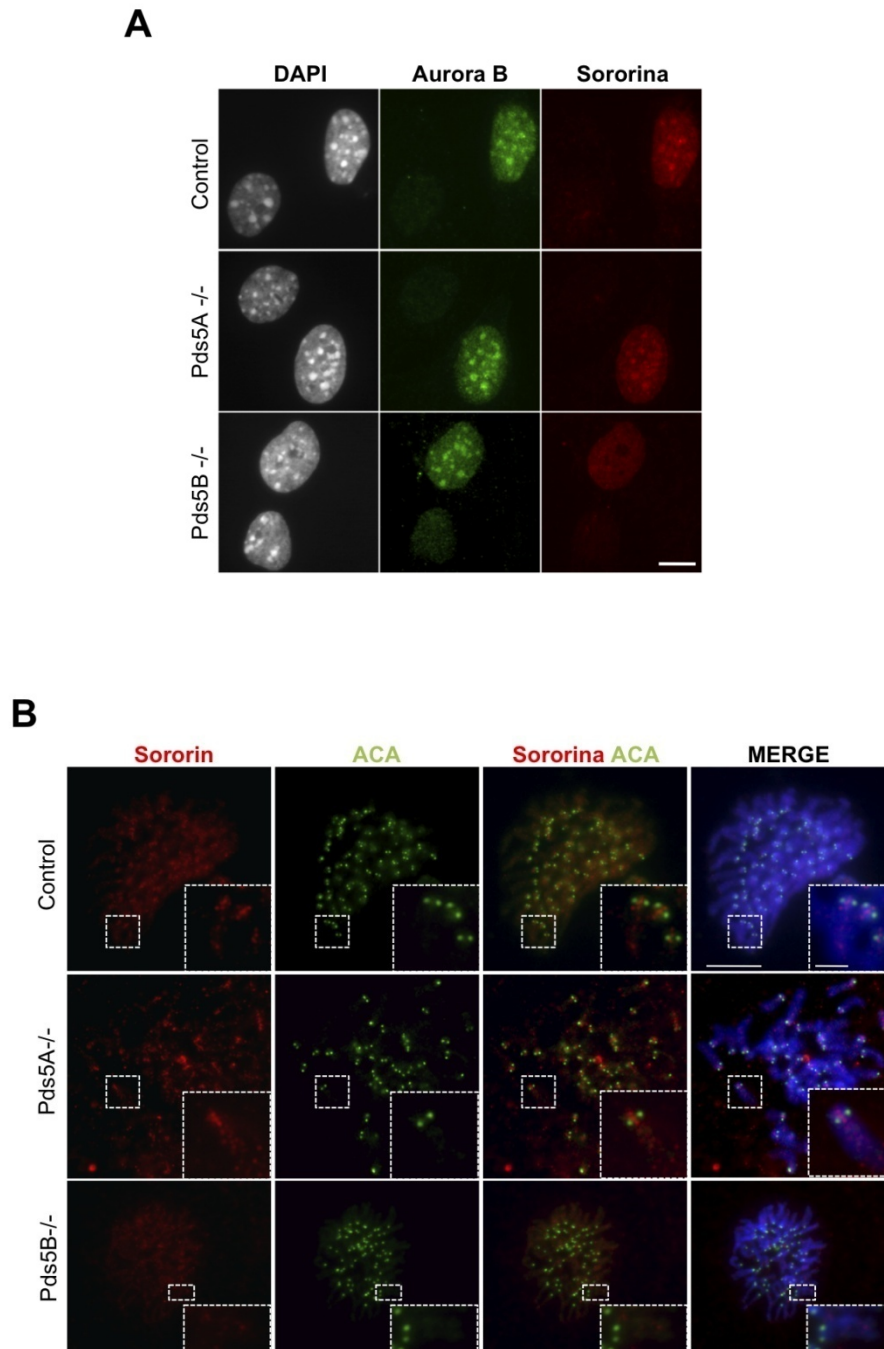


Figura 31. La presencia de Cohesina en la región pericentromérica depende de Pds5B. **A.** Imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la localización de Sororina (rojo) en fibroblastos primarios control, Pds5A^{-/-} y Pds5B^{-/-}. La tinción de Aurora B identifica células en G2. Las células negativas para la tinción con Aurora B lo son también para la Sororina. Barra de escala: 10 μ m. **B.** Microscopía de fluorescencia en cromosoma metafásicos preparados mediante citospin de fibroblastos del genotipo indicado. Sororina (rojo) aparece en la región entre los dos cinetocoros hermanos, marcados con ACA (*anti centromere antibody*; en verde). El ADN se tiñó con DAPI (azul). Barra de escala: 10; magnificación: 2 μ m.

7. Consecuencias de la falta de Pds5B en segregación cromosómica

7.1 Defectos de segregación cromosómica y aneuploidía en ausencia de Pds5B

El severo defecto de cohesión centromérica de las células carentes de Pds5B debería ocasionar problemas para la segregación cromosómica. Efectivamente, al examinar células en anafase se detectan cromosoma retrasados (*lagging chromosomes*) y, en menor medida, puentes de cromatina (*chromatin bridges*). En total, el número de anafases aberrantes en el caso de las células sin Pds5B supera el 55% frente al 20% en las células control (Figura 32A). Al analizar las anafases en secciones de tejido procedentes de embriones a día 18,5 dpc se obtienen resultados similares (Figura 32B).

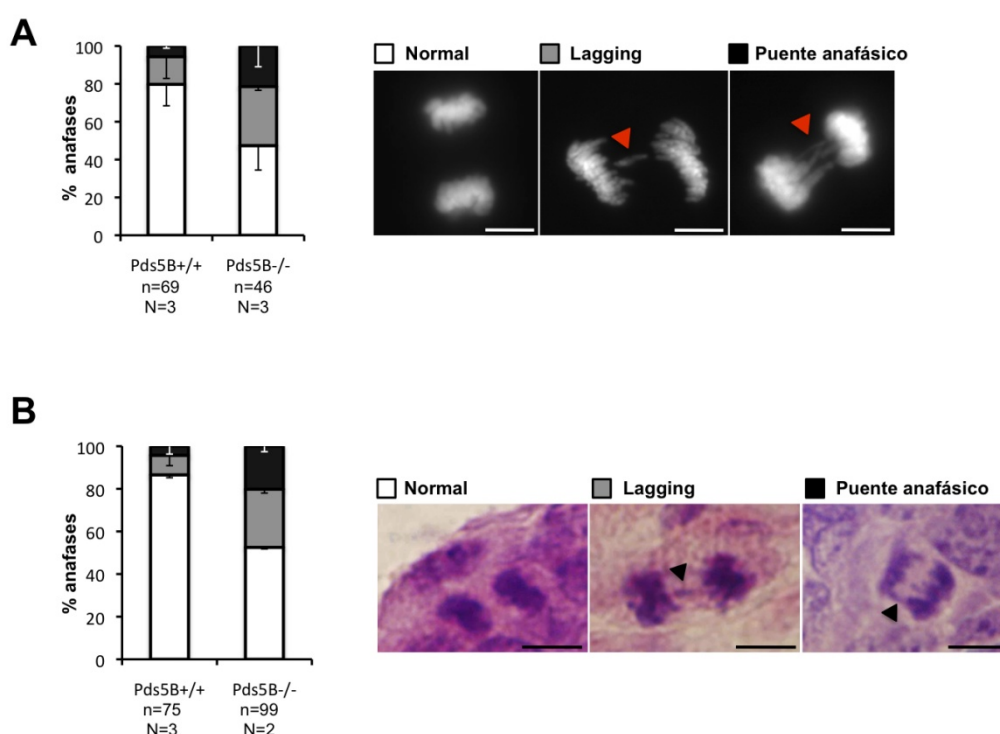


Figura 32. Problemas de segregación cromosómica en ausencia de Pds5B. **A.** Cuantificación de los defectos de segregación cromosómica como los que aparecen en las imágenes de la derecha (cromosomas rezagados o *lagging* y puentes anafásicos) en MEFs primarios. Los incrementos que se observan en células sin Pds5B son significativos ($p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente). Barra de escala: $10\mu\text{m}$. **B.** El mismo tipo de defectos se cuantificó en cortes de piel de embriones de 18,5dpc teñidos con H-E. Las diferencias encontradas en muestras Pds5B-/- frente al control tanto en cantidad de puentes anafásicos ($p < 0,001$) como en cromosomas rezagados ($p < 0,001$) son estadísticamente significativas. N, número de clones; n, número de anafases. Barra de escala: $5\mu\text{m}$.

De acuerdo con el hecho de que los cromosomas retrasados pueden dar lugar a la formación de micronúcleos (Crasta et al., 2012), también observamos una mayor incidencia de los mismos en los cultivos de MEFs *knock out* para Pds5B (Figura 33A). La presencia de husos

multipolares, otra característica de las células con cohesión defectuosa y problemas de segregación, se observa igualmente en estas células (Figura 33B)

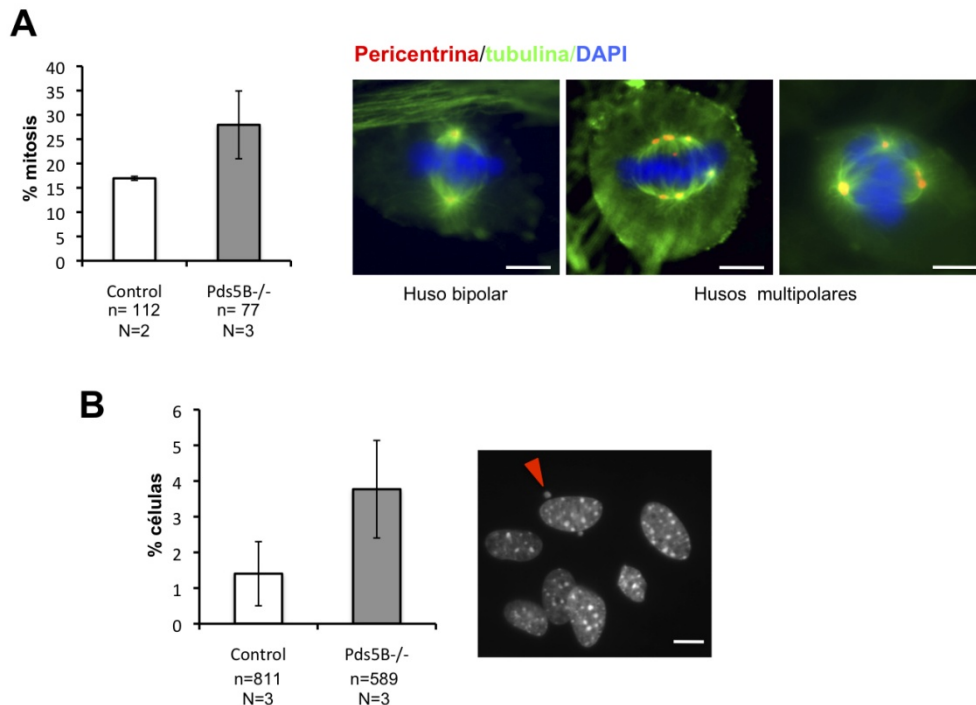


Figura 33. Problemas de segregación cromosómica en ausencia de Pds5B. **A.** Cuantificación del número de husos mitóticos multipolares en células primarias control y Pds5B^{-/-}. A la derecha se muestran imágenes de microscopía de células teñidas con pericentrina (rojo), tubulina (verde) y DAPI (azul). **B.** Cuantificación de la incidencia de micronúcleos en células primarias de los genotipos indicados. En la imagen de la derecha se señala una célula con un micronúcleo. N, número de clones; n, número de mitosis (A) o células (B) analizadas. Barra de escala: 10 μ m.

Para poder observar en tiempo real el comportamiento de estas células al pasar por mitosis decidimos grabar películas de MEFs de genotipo salvaje y *knock out* para Pds5B. Para ello se cultivaron las células en medio sin suero y en condiciones de confluencia durante 72h. Pasado este tiempo se transfectaron con un plásmido que expresa la histona H2B marcada con mCherry para visualizar fácilmente la cromatina, se sembraron en condiciones que estimulan la proliferación (60-70% confluencia y 20% de suero) y se grabaron vídeos de múltiples campos durante 24 horas en el microscopio de fluorescencia (Figura 34A). El análisis de la progresión a través de mitosis de células individuales puso de manifiesto que las células sin Pds5B no sufren un retraso considerable en prometáfase pues, en promedio, inician la anafase apenas unos minutos más tarde que las células control (Figura 34B). Alrededor del 11% de estas células mueren en mitosis (frente a menos del 1% en células control; líneas negras en Figura 34B) y el 5,5% no pueden completar el proceso de citocinesis y salen a interfase como células binucleadas (menos del 1% en células control; líneas verdes en Figura 34B).

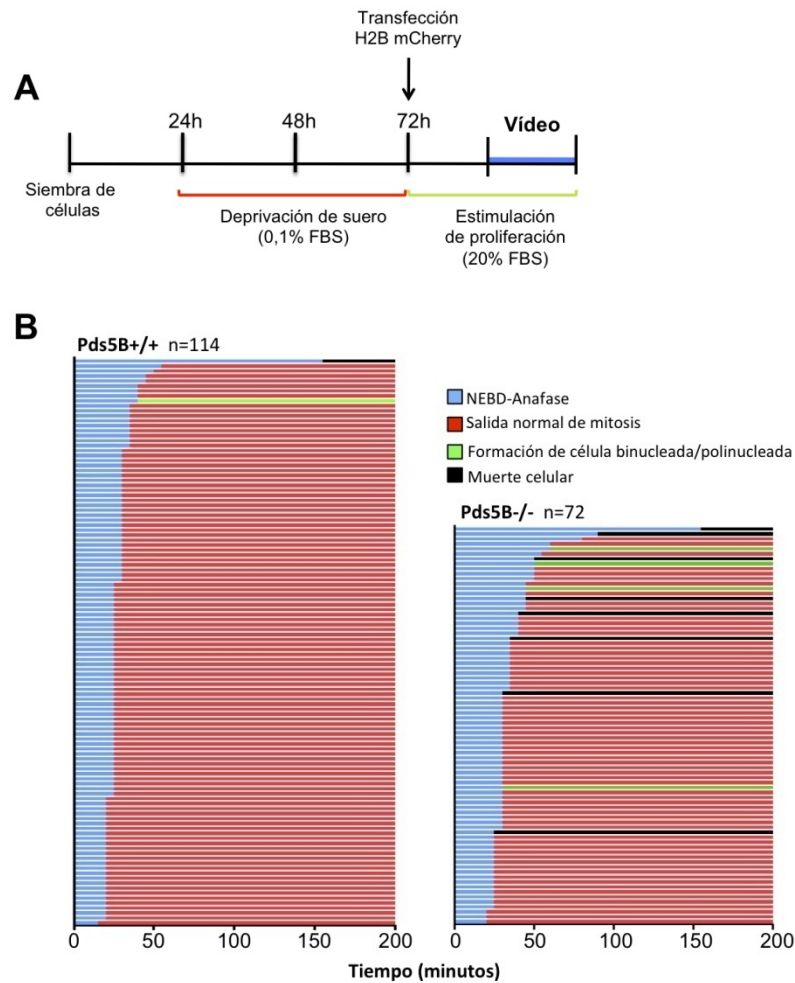


Figura 34. La progresión a través de mitosis es más problemática cuando falta Pds5B. **A.** Esquema de la realización del experimento. **B.** Representación gráfica de la progresión de células individuales a través de mitosis. La rotura de la envoltura nuclear (NEBD, *nuclear envelope breakdown*) se considera el $t=0$. Cada célula está representada por una línea coloreada según el código que se indica. n, número de células analizadas.

La mayor incidencia de células binucleadas puede observarse también en células fijadas y teñidas con faloidina para demarcar los bordes celulares. En cultivos asincrónicos de MEFs control la incidencia es del 5% y aumenta casi 3 veces en los MEFs sin Pds5B (Figura 35).

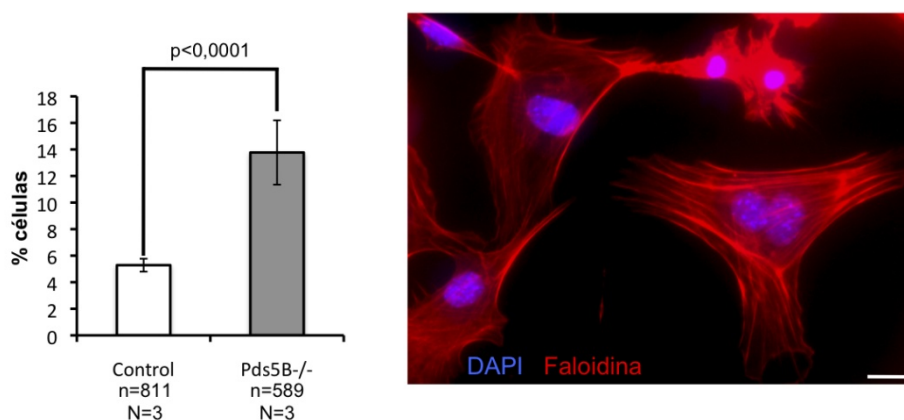


Figura 35. Mayor incidencia de células binucleadas en ausencia de Pds5B. Cultivos asincrónicos de MEFs control y Pds5B-/- se tiñeron con DAPI (azul) y faloidina (rojo) con el objeto de delimitar el contorno celular y se contaron las células binucleadas. N, número de clones; n, número de células analizadas. Barra de escala: 25µm.

Las células binucleadas, con micronúcleos o con husos multipolares propician la aneuploidía. Al contar el número de cromosomas en metafases de fibroblastos primarios (pase 1 a 3) observamos que el porcentaje de metafases aneuploides es del 58,14% en los MEFs sin Pds5B frente al 23,2% en los MEFs de genotipo salvaje y 23% en los MEFs deficientes en Pds5A (Figura 36A). Puesto que los MEFs en cultivo tienen tendencia a acumular aneuploidías, examinamos también hepatocitos recién extraídos de hígados de embriones 14,5 dpc. En este caso, sólo el 12,73% de las metafases del genotipo salvaje son aneuploides, mientras que el 43,36% de las procedentes de embriones *knock out* de Pds5B presentan esta característica.

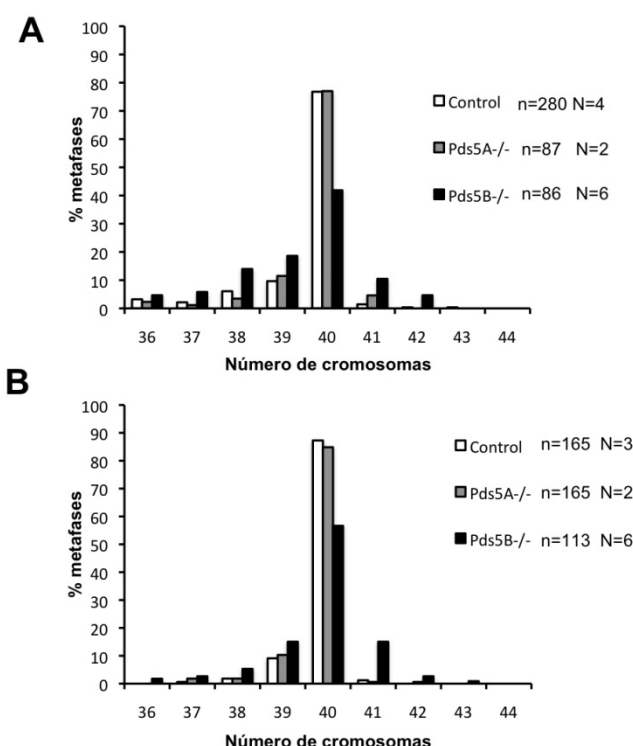


Figura 36. La falta de Pds5B promueve la aparición de aneuploidías. A. Gráfico de barras que muestra la distribución del número de cromosomas en metafases de MEFs primarios de los genotipos que se indican. La dotación normal en ratón (40 cromosomas) ocupa el centro de la distribución. B. Perfil de ploidía como el mostrado en A correspondiente a las metafases de hepatocitos primarios. N, número de clones; n, número de metafases analizadas

7.2 Las células sin Pds5B tienen problemas para biorientar los cromosomas.

Como se describe en la Introducción, la cohesión es esencial para el proceso de biorientación de los cromosomas en la placa metafásica, pues genera tensión al oponerse a las fuerzas de los microtúbulos (MT) que tiran de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos del huso. Cuando no hay tensión la quinasa Aurora B está activa y desestabiliza la interacción cinetocoro-MT con el resultado de un cinetocoro vacío (Liu et al 2009; Salimian et al 2011).

Esta señal activa el punto de control de mitosis o SAC e impide la progresión a anafase. Durante el proceso de formación de la placa metafásica, los cinetocoros se unen a microtúbulos de los dos polos en un proceso que implica múltiples uniones erróneas que deben corregirse para llegar a alcanzar una unión anfitélica, o biorientación, en la que cada cinetocoro hermano está unido a microtúbulos de polos opuestos (Figura 37A y 37 B). Las otras uniones posibles se clasifican como monotéticas, en la que uno de los cinetocoros aún no se ha unido a microtúbulos; sintéticas, en la que ambos cinetocoros se unen a microtúbulos procedentes del mismo polo, y son convertidas en monotéticas por Aurora B; y merotéticas, en las que los dos cinetocoros están unidos a microtúbulos de polos opuestos pero además uno de ellos está unido a los dos polos. Este último tipo de unión genera tensión y no activa el SAC. Cuando comienza la anafase, la cromátida unida a los dos polos aparece como un cromosoma retrasado entre las masas de cromosomas que se separan. La merotelia parece ser la causa más frecuente de inestabilidad cromosómica (Gegan et al. 2008).

Para investigar en detalle cómo tiene lugar la formación de la placa metafásica en las células sin Pds5B analizamos en primer lugar las uniones MT-cinetocoro. Para ello sometimos a las células a un tratamiento con calcio que despolimeriza preferentemente a los microtúbulos no cinetocóricos. Tras fijar y teñir las células con anticuerpos contra tubulina y proteínas del cinetocoro, se eligieron 5 células de cada genotipo en las que la placa metafásica parecía estar ya formada y se tomaron fotos en el microscopio confocal. El examen de más de 200 pares cinetocóricos reveló un menor número de uniones anfitélicas en las metafases de células sin Pds5B (52% frente al 65% en células de genotipo salvaje; Figura 37C). Es más, las uniones no anfitélicas más comunes en los MEFs control eran las monotéticas, que no requieren Aurora B para convertirse en anfitélicas, y sólo en una metafase algunos cromosomas tenían uniones erróneas. En cambio, las 5 metafases del Pds5B *knock out* tenían cromosomas no biorientados con uniones que requerían Aurora B para corregirse.

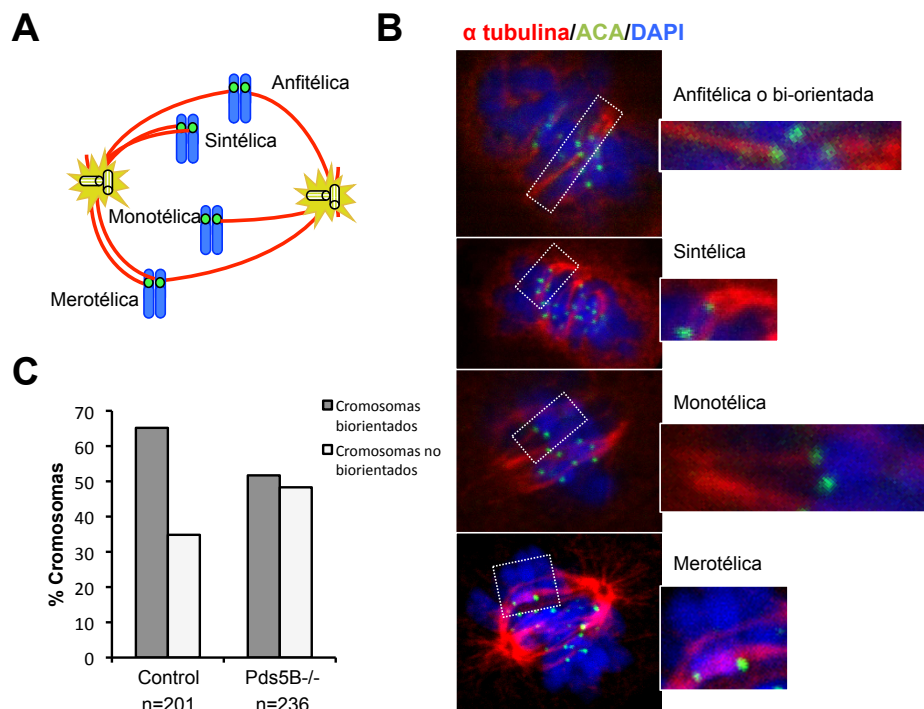


Figura 37. Las células sin Pds5 tienen problemas para biorientar los cromosomas en metafase. **A.** Esquema que resume el tipo de uniones cinetocoro-MT que se producen durante el proceso de biorientación. **B.** Imágenes de microscopía confocal de placas metafásicas de MEFs primarios tratados con calcio para eliminar los microtúbulos no cinetocóricos y teñidos con tubulina (rojo), ACA para marcar los cinetocoros (verde) y DAPI (azul). Se muestran ejemplos de las uniones indicadas en **(A)**. **C.** Cuantificación del número de cromosomas mal orientados (la suma de todas las uniones no anfitéticas) en cinco metafases de cada genotipo. n, número de cromosomas (o pares cinetocóricos) analizados.

Otra forma de examinar el proceso de biorientación es tratar las células con monastrol, un inhibidor de la kinesina Eg5 (Mayer et al. 1999). Este tratamiento bloquea las células en prometafase con husos mitóticos monopolares en los que la mayoría de los cromosomas están orientados sintéticamente. Tras eliminar la droga, las células restablecen un huso mitótico bipolar en un proceso que requiere Aurora B. En el momento de eliminar el monastrol se añade al medio el inhibidor del proteasoma MG132 para evitar la entrada en anafase de las células que consigan biorientar los cromosomas y también porque su presencia impide la progresión a mitosis de células en G2, lo cual evita que existan husos bipolares que no procedan de husos monopolares. A distintos tiempos tras el lavado del monastrol se toman muestras de células y se cuantifica el número de huso monopolares, bipolares pero sin los cromosomas alineados en la placa o bipolares con cromosomas alineados (Figura 38A y 38B). En las células control, el 90% de las células presenta husos bipolares a los 30 minutos, 55% con los cromosomas biorientados. A las 3 horas este porcentaje de éstas últimas aumenta hasta el 90% (Figura 38C). En cambio, en las células sin Pds5B el proceso es más inefficiente. A los 30 minutos el 70% de las células tiene algún tipo de huso bipolar, pero sólo 40% son metafásicos.

Tras 3 horas sólo el 70% de los husos tiene todos los cromosomas alineados y el 6% son aún monopolares. Estos resultados indican que la función correctora de Aurora B está ciertamente alterada en ausencia de Pds5B.

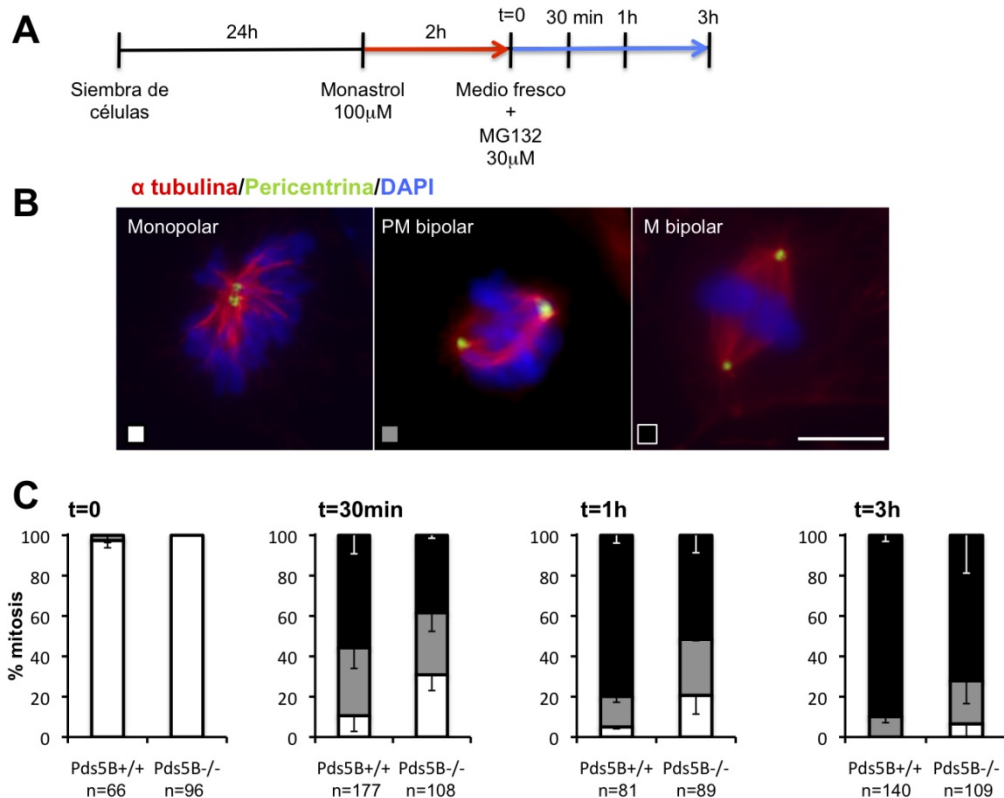


Figura 38. El proceso de biorientación mediado por Aurora B es ineficiente en ausencia de Pds5B. **A.** Esquema del protocolo experimental del ensayo de biorientación. **B.** Las células recogidas a distintos tiempos se fijaron y tiñeron con tubulina (rojo), pericentrina (verde) y DAPI (azul). Imágenes representativas de los fenotipos en que se clasificaron las figuras mitóticas analizadas y que se cuantifican en **C.** n, número de figuras mitóticas analizadas. Barra de escala: 10 μm.

7.3 Haspin y Aurora B no se localizan de forma adecuada en ausencia de Pds5B

Para realizar su función en la corrección de uniones erróneas MT-cinetocoro, Aurora B tiene que situarse en la región entre los centrómeros hermanos. Así pudimos verlo en las células de genotipo salvaje o carentes de Pds5A (Figura 39A, paneles superiores). Sin embargo, en más del 90% las células sin Pds5B observamos que la señal era más difusa y difícil de adscribir a la región entre las señales centroméricas (Figura 39A, panel inferior; cuantificación en Figura 39B).

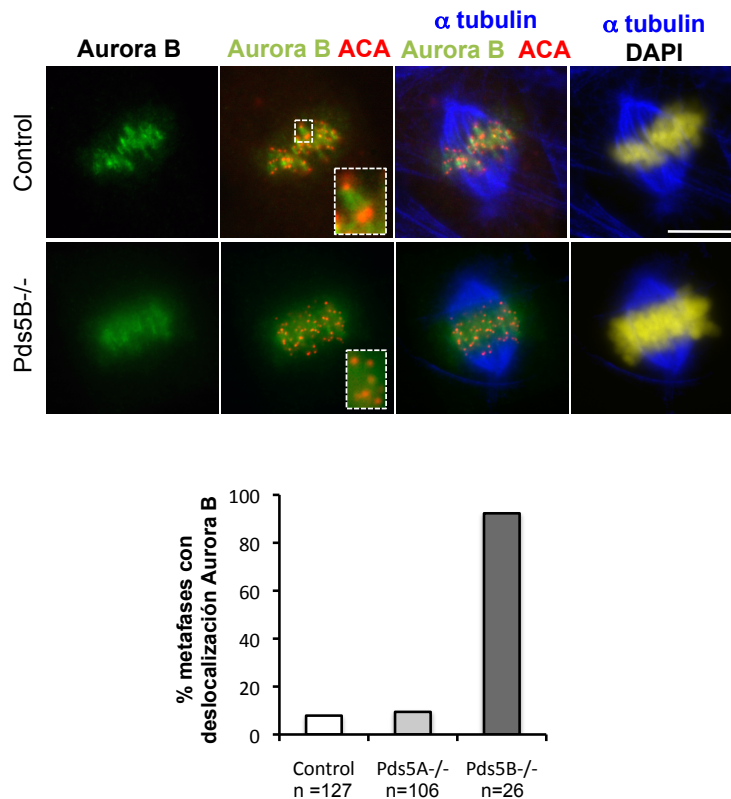


Figura 39. La localización de Aurora B está alterada en ausencia de Pds5B. Imágenes de microscopía de fluorescencia de metafases de fibroblastos primarios teñidos con anticuerpos de Aurora B (verde), ACA (rojo, que marca los cinetocoros) y tubulina (azul). En los paneles de la derecha el ADN, teñido con DAPI, aparece en amarillo. Arriba se muestra una metafase de un fibroblasto control con localización correcta de Aurora B. En la magnificación se aprecia la señal discreta entre los dos cinetocoros que evidencia la tensión a la que está sometido el cromosoma. Abajo se muestra una metafase de un fibroblasto Pds5B^{-/-} en la que Aurora B está deslocalizada. En la gráfica de la parte inferior se representa la frecuencia del fenotipo de deslocalización de Aurora B en metafases de MEFs primarios control, Pds5A^{-/-} y Pds5B^{-/-}. n, número total de metafases analizadas. Barra de escala: 10 μ m.

La localización del CPC (y por tanto de su subunidad catalítica, Aurora B) en el centrómero está determinada por la intersección entre dos marcas de cromatina: la histona H2B fosforilada en la Serina 121 por Bub1 (Kawashima et al., 2010) y la histona H3 fosforilada en la Treonina 3 (H3pT3) por Haspin (Dai et al., 2006, Yamagishi et al., 2010). La localización centromérica de Bub1 en metafase y la intensidad de la señal detectable es similar en MEFs de genotipo salvaje o sin Pds5A o Pds5B (Figura 40). En el caso de Haspin no existe un anticuerpo apropiado para inmunofluorescencia, pero sí es posible detectar su sustrato, H3pT3. En metafases de MEFs control preparadas mediante citospin encontramos H3pT3 en la región entre los centrómeros hermanos en el 90% de las metafases examinadas (panel superior en Figura 41). Sin embargo, en el 90% de las células sin Pds5B H3pT3 presenta una localización distinta distribuyéndose a lo largo de los brazos cromosómicos sin observarse una

acumulación en la región centromérica (Figura 41, panel inferior). En ambos casos la tinciones de H3pT3 y de Aurora B son idénticas.

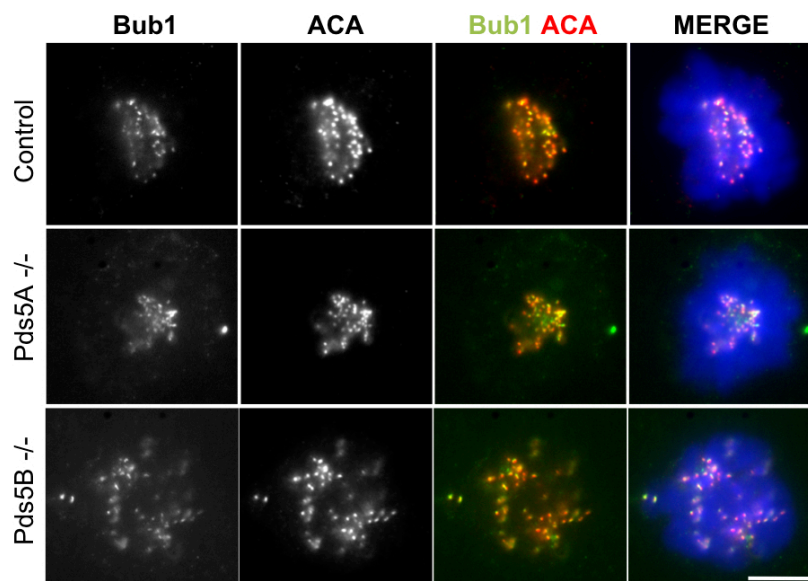


Figura 40. La localización centromérica de Bub1 no depende de las proteínas Pds5. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la proteína Bub1 en metafases de fibroblastos primarios. Las células fueron tratados con detergente antes de la fijación. Como marcador de centrómero se muestra la tinción con ACA. Barra de escala: 5µm.

Un estudio reciente en la levadura *S. pombe* muestra que la localización de Haspin en la región centromérica depende de Pds5 (en este organismo solo hay una versión de la proteína) y de Swi6 (el homólogo de HP1). Nuestros resultados sugieren que esta regulación está conservada en mamíferos pues demuestran que Pds5B es necesaria para la correcta acumulación de H3pT3 en el centrómero y ésta, a su vez, para la correcta localización del CPC. En las células sin Pds5A, como es de esperar, no detectamos ninguna alteración en la localización de H3pT3 o Aurora B.

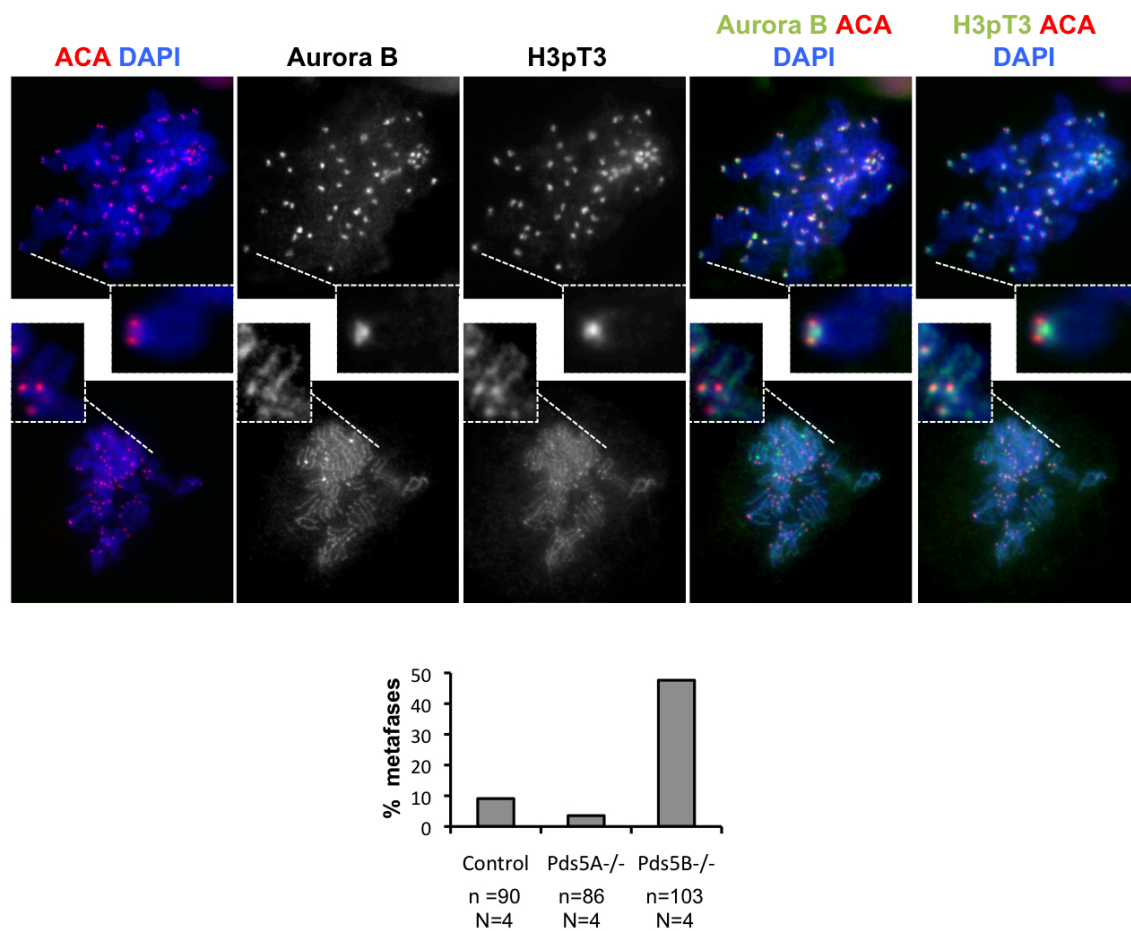


Figura 41. H3pT3 está deslocalizada en Pds5B-/-. Imágenes representativas de metafases preparadas mediante citospin y teñidas con los anticuerpos indicados. En la metafase de los paneles superiores, tanto AuroraB como H3pT3 se acumulan en la región entre los centrómeros (marcados con ACA). En los paneles inferiores se muestra una metafase en la que Aurora B y H3pT3 aparecen a lo largo de los brazos cromosómicos. La incidencia de este tipo de tinción se cuantificó en muestras de los genotipos indicados. N, número de clones; número de metafases analizadas.

En resumen, la falta de Pds5B produce defectos de segregación cromosómica al menos por dos razones. La primera es que la cohesión mediada por la Cohesina requiere Pds5B en la región centromérica. Pds5B factor facilita la acetilación de la Cohesina y su estabilización por Sororina en esta región, en tanto que Pds5A lo hace a lo largos de brazos y en el telómero. La segunda razón es que Pds5B es responsable (directo o indirecto) de dirigir a Haspin a la región centromérica, y al permitir la acumulación de H3pT3, contribuye a la localización correcta del CPC. Esta localización, a su vez, permite a Aurora B llevar a cabo su labor correctora de uniones MT-cinetocoro erróneas de forma eficiente y permitir así la biorientación de los cromosomas.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El complejo Cohesina es esencial para la proliferación celular, pues media el apareamiento entre las cromátidas hermanas o cohesión y de este modo asegura una segregación cromosómica correcta. A pesar de la labor investigadora de muchos grupos, aún se desconocen los detalles moleculares que determinan el comportamiento de la Cohesina, incluyendo su asociación a cromatina, mediado por el heterodímero Scc2/NIPBL-Scc4/MAU2, o el establecimiento de la cohesión al paso de las horquillas replicativas, en el que las acetiltransferasas Esco1 y Esco2 son fundamentales. Tampoco está claro cómo esta acetilación y la unión de Sororina neutralizan la actividad desestabilizadora de Wapl. Cabe imaginar que esta actividad desestabilizadora dota a la Cohesina de un dinamismo necesario para permitir procesos como la transcripción en la cromatina interfásica. Al mismo tiempo, puesto que la cohesión sólo puede establecerse durante la fase S, es necesario que al menos una fracción de la Cohesina unida a cromatina no sea dinámica, pues si la Cohesina cohesiva se disociara de la cromatina en G2, por ejemplo, nueva Cohesina podría cargarse, pero ya no sería cohesiva. El papel de Pds5 en el comportamiento del complejo no está claro y según el organismo y el momento del ciclo celular, parece tener efectos positivos y negativos sobre la estabilidad de la Cohesina y por tanto, de la cohesión. Esto podría deberse a su capacidad para actuar como “pivote” sobre el que se apoyarían otros factores de cohesión. El trabajo que se recoge en esta tesis intenta esclarecer las funciones de Pds5 así como indagar en la especificidad de las dos versiones de esta proteína que existen en células de vertebrados, Pds5A y Pds5B. Para ello se han generado alelos murinos nulos para los genes que las codifican y se han caracterizado los fenotipos celulares que producen.

1. Letalidad embrionaria tardía con características diferentes en ausencia de Pds5A o Pds5B.

Los animales con un alelo nulo de Pds5A o Pds5B son aparentemente normales y fértiles. No se observan diferencias significativas en las curvas de supervivencia entre los ratones heterocigotos Pds5B^{+/-} y los de genotipo salvaje (datos no mostrados). En el caso de Pds5A aún no tenemos números suficientes, pero tampoco parece haber una reducción significativa de la viabilidad en animales Pds5A^{+/-}. Al cruzar los animales heterocigotos entre sí, sin embargo, no se obtienen crías homocigotas para el alelo nulo en ninguno de los dos casos. Para Pds5A la letalidad no es aún muy aparente a 12,5dpc (21% de embriones sin Pds5A frente a 25% esperado) pero sí es notoria en estadios tardíos: de 66 embriones extraídos entre

16,5 y 18,5 dpc, sólo 2 de los 16 esperados, esto es, el 3% son Pds5A^{-/-}. El tamaño de estos embriones sin Pds5A es claramente menor que el de sus hermanos de camada y muestran múltiples las anomalías en organogénesis y diferenciación. Un mayor número de embriones en estadios tardíos son Pds5B^{-/-} (14 de 108, el 13%) y la diferencia de tamaño con respecto a sus hermanos de camada no es tan acusada como en el caso de los Pds5A^{-/-}. El análisis histológico tampoco evidencia problemas claros en el desarrollo de órganos vitales, si bien el número de embriones examinados es muy pequeño. Puesto que los niveles de expresión de Pds5A y Pds5B en tejidos adultos y células embrionarias examinadas no son muy diferentes, este resultado es la primera evidencia de la especificidad funcional de Pds5A y Pds5B.

El análisis de los MEFs deficientes en Pds5A o Pds5B que ocupa buena parte de esta tesis sugiere que en el caso de Pds5B, pero no de Pds5A, la letalidad podría guardar relación con la aneuploidía. En ratón todas las aneuploidías autosómicas son letales durante el desarrollo embrionario, con la excepción de la trisomía del cromosoma 19, que produce muerte perinatal (Epstein 1985). Sin embargo, algunas trisomías son toleradas hasta estadios postimplantacionales y los MEFs aneuploides muestran problemas de proliferación y su metabolismo está alterado (Williams et al., 2008). Es posible que la aparición de aneuploidías espontáneas en células precursoras de distintos tejidos en los embriones sea la causante del menor tamaño y la letalidad de los embriones Pds5B^{-/-}. Alternativamente, quizá sea la alteración en los patrones transcripcionales lo que cause la letalidad. La caracterización de un modelo de ratón deficiente en la subunidad SA1 de la Cohesina ha mostrado la importancia de ésta en la regulación de la expresión de numerosos genes esenciales durante el desarrollo embrionario (Remeseiro et al., 2012b).

Durante el desarrollo de esta tesis se publicaron modelos de ratón deficientes para Pds5A y Pds5B basados en trampa génica y *gene targeting*, respectivamente (Zhang et al., 2009, Zhang et al., 2007). En ambos casos los autores encuentran letalidad perinatal. En los animales supervivientes o en embriones tardíos, la falta de Pds5A o de Pds5B da lugar a fenotipos muy similares entre sí y que guardan relación con la patología del síndrome CdLS. Estos defectos incluyen el retraso en el crecimiento, paladar hundido, problemas en la formación del esqueleto, malformación cardíaca o defectos en la migración de las neuronas del sistema entérico. No se encontraron defectos de cohesión en MEFs de ninguno de los dos genotipos, si bien el análisis de este fenotipo en particular y de la posible base molecular de los defectos fenotípicos observados es muy superficial. En cualquier caso, la conclusión de estos autores es que existe una redundancia clara en las funciones de Pds5A y Pds5B. Nuestros resultados ofrecen un panorama bien distinto, al menos en lo referente a la cohesión y segregación cromosómica. Aunque de momento no es posible descartar una contribución de

los defectos de cohesión y por tanto de proliferación a la patología del síndrome CdLS, aumentan las evidencias que sugieren que el papel de Cohesina en la regulación de la expresión génica es la principal causa de dicha patología (Kawauchi et al., 2009, Liu and Krantz, 2009). Si atendemos al análisis histológico de Zhang y colaboradores (2007, 2009), más extenso que el que se presenta en esta tesis, es probable que las dos proteínas Pds5 contribuyan a la regulación transcripcional mediada por la Cohesina. Próximamente pensamos llevar a cabo un estudio que combine el análisis de la transcripción y de la distribución de Cohesina en células con y sin Pds5A o Pds5B para explorar la posible especificidad de una versión u otra de Pds5 en la regulación de la transcripción.

2. Pds5 como regulador de la estabilidad de la asociación de Cohesina a cromatina

Pds5 se asocia a cromatina con la misma dinámica que Cohesina y de forma dependiente de ésta, desde telofase hasta la siguiente mitosis (Losada and Hirano, 2005, Sumara et al., 2000). La asociación de Cohesina con cromatina, por el contrario, es independiente de Pds5 (Hartman et al., 2000, Tanaka et al., 2001, Stead et al., 2003, Losada et al., 2005), pero no así su estabilidad. En células en interfase, la falta de Pds5A o Pds5B no afecta de forma significativa a la cantidad global de Cohesina en cromatina, si bien eliminación de ambas produce un aumento moderado pero significativo. Dicho aumento podría reflejar un comportamiento menos dinámico de la Cohesina en ausencia de Pds5. Confirmar esta posibilidad requerirá experimentos de FRAP en células con y sin Pds5 y en distintas fases del ciclo, por ejemplo, antes y después de la replicación del ADN. Como se menciona en la Introducción, los experimentos de FRAP distinguen tres poblaciones de Cohesina que corresponden a Cohesina soluble, Cohesina unida a cromatina pero no cohesiva y la Cohesina cohesiva. Esta última aparece tras la replicación (Gerlich et al., 2006) y es dependiente de la presencia de Sororina (Schmitz et al., 2007). En células con niveles muy reducidos de Wapl se observa un aumento en la cantidad de Cohesina en cromatina al tiempo que experimentos de FRAP revelan un alargamiento del tiempo medio de residencia de la Cohesina no cohesiva en cromatina (Kueng et al., 2006). Por otro lado, será importante investigar las consecuencias del menor dinamismo de la Cohesina en la replicación y la transcripción. En el caso de la replicación, de momento sólo hemos examinado la progresión a través de fase S en células que todavía tienen una de las dos proteínas Pds5, y no parece afectada. Queda por analizar la condición en que ambas estén ausente y el uso de técnicas más sofisticadas que nos permitan

medir la progresión de la horquilla replicativa en moléculas individuales (Remeseiro et al., 2012a, Terret et al., 2009).

En *Xenopus* se ha descrito que la eliminación de Pds5A y Pds5B mediante inmunodepleción afecta a la disociación de profase de forma tan aguda como la depleción de Wapl (Shintomi and Hirano, 2009, Kueng et al., 2006, Gandhi et al., 2006). Nuestros resultados demuestran claramente que este no es el caso en células somáticas de mamífero. Sin embargo, cabe recordar que la disociación de la Cohesina en profase deja en cromatina una cantidad muy pequeña cuya detección con anticuerpos anti-Cohesina rara vez se consigue. Esta detección requiere estrategias alternativas entre las que destaca el uso de un anticuerpo anti-myc en líneas celulares que expresan Scc1-8xmyc (Whelan et al., 2012, Serrano et al., 2009, Koch et al., 2008, Waizenegger et al., 2000). Uno de nuestros próximos experimentos es introducir Scc1-8xmyc en MEFs con y sin Pds5B o Pds5A, y ver si encontramos diferencias en la cantidad de Cohesina que queda en los cromosomas metafásicos. En cualquier caso, lo que sí es claro es la presencia de Pds5 no es indispensable para la disociación de Cohesina en profase mediada por Wapl.

3. Especificidad de Pds5A y Pds5B en la cohesión en distintas regiones cromosómicas

En las células somáticas de vertebrados existen dos complejos Cohesina distintos que se componen de las subunidades Smc1, Smc3, Rad21 y bien SA1 o SA2. La Cohesina-SA1 es esencial para la cohesión telomérica, la Cohesina-SA2 es responsable de la cohesión centromérica y ambas contribuyen de forma similar a la cohesión a lo largo de los brazos (Remeseiro et al., 2012a, Canudas and Smith, 2009). Con la existencia de dos proteínas Pds5 capaces de interaccionar con ambos complejos Cohesina, la diversificación aumenta. Los datos aportados en este trabajo muestran también una división de funciones entre Pds5A y Pds5B en cohesión a lo largo del cromosoma. Pds5B parece ser el principal mediador de la cohesión en la región centromérica, Pds5A es más relevante para la cohesión en los telómeros y ambas contribuyen a la cohesión a lo largo de los brazos cromosómicos, si bien el papel de Pds5A parece más crítico. No hemos podido calcular la abundancia relativa de Pds5A y Pds5B en MEFs, pero al menos encontramos tres veces más mRNA de Pds5A. No podemos por tanto descartar la posibilidad de que la mayor relevancia de Pds5A se deba simplemente a su mayor abundancia.

La cohesión, además de su importancia en la segregación cromosómica, es esencial para la reparación del daño. En células humanas se ha descrito recientemente una interacción entre Pds5B y BRCA2 que es necesaria para mediar la respuesta a daño cuando las células se

exponen a hidroximetilurea o afidicolina pero también a irradiación (Brough et al., 2012). Si bien los autores se centran en Pds5B por razones poco claras, BRCA2 también interacciona con Pds5A y es muy probable que su eliminación afecte a la reparación del daño en la misma o incluso mayor medida. Nosotros observamos que, tras exponer las células a bajos niveles de afidicolina, la reparación es menos eficiente en ausencia tanto de Pds5A como de Pds5B, en magnitud comparable. Dejamos para el futuro un estudio más detallado de la especificidad de Pds5A y Pds5B en procesos de reparación de daño.

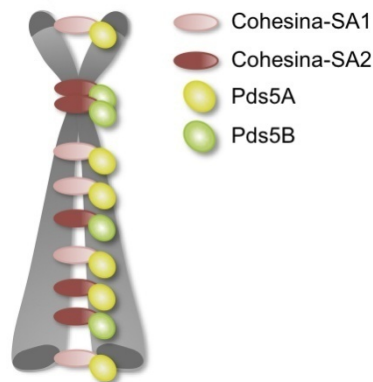


Figura 42. Mapa de la cohesión a lo largo del cromosoma. Distribución de las cuatro versiones del complejo Cohesina resultantes de la combinación de Cohesina-SA1 y Cohesina-SA2 con Pds5A y Pds5B.

En cualquier caso, combinando los resultados de esta tesis y los de Remeseiro et al (2012)(Remeseiro et al., 2012a) se obtiene un “mapa” de distribución de la especificidad de estos complejos que propone el predominio de complejos Cohesina-SA2-Pds5B en el centrómero, Cohesina-SA1-Pds5A en el telómero, y una mezcla de todos los complejos posibles aunque con preferencia de complejos que contengan Pds5A, a lo largo de los brazos (Figura 42). Resultados preliminares de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) apuntan a una presencia similar de Pds5A y Pds5B en los sitios característicamente enriquecidos en Cohesina a lo largo de los brazos (por ejemplo, en el gen *myc*) mientras que detectamos una acumulación de Pds5B en la región pericentromérica ocupada por el ADN satélite mayor de ratón (Figura 43). Cómo se genera esta especificidad no está claro, pero es probable que al menos en parte venga dictada por la interacción con proteínas que se localizan preferentemente en cada región. Se ha visto, por ejemplo, que existe una interacción específica de SA1 con las proteínas teloméricas TIN2 y TRF1 (Canudas et al., 2007). La búsqueda de interacciones específicas de Pds5A y Pds5B mediante análisis proteómico de inmunoprecipitados obtenidos con los anticuerpos correspondientes puede ser un primer paso para explorar las bases moleculares de la especificidad funcional de estas proteínas.

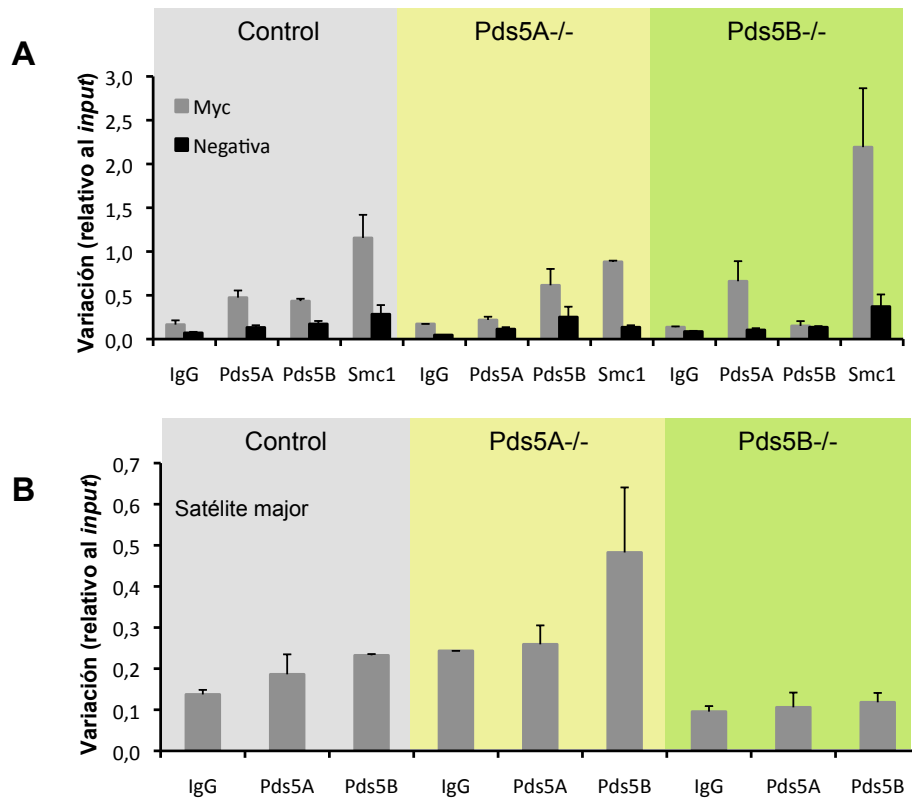


Figura 43. Localización de las proteínas Pds5 en distintas regiones cromosómicas medida por ChIP. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de fibroblastos inmortalizados de los genotipos indicados en la región del gen myc y una región adyacente en la que no se une Cohesina (negativa) **(A)** y en el satélite *mayor* de ratón, principal componente de la heterocromatina pericentromérica **(B)**.

4. La función de Pds5B es esencial para establecer y mantener la cohesión centromérica.

Para que la Cohesina se convierta en “cohesiva” la subunidad Smc3 del complejo debe ser acetilada por las acetiltransferasas Esco1/2 durante la fase S. Resultados recientes en *Xenopus* indican que esta acetilación puede ocurrir de forma independiente a la replicación, pero en ese caso no genera cohesión (Song et al., 2012, Higashi et al., 2012). Es probable que la acetilación que tiene lugar al paso de la horquilla replicativa genere un cambio conformacional transitorio que permite a la Cohesina atrapar a las dos cromátidas y al mismo tiempo neutralizar la acción de desestabilizadora de Wapl (Chan et al. 2012). En vertebrados esto requiere, además, la unión de Sororina (Nishiyama et al., 2010, Lafont et al., 2010).

La depleción simultánea de Pds5A y Pds5B reduce considerablemente la presencia de Sororina en cromatina ensamblada en extractos de *Xenopus*, lo mismo que hemos visto nosotros en MEFs. Cuando se reducen los niveles de Esco1 y Esco2 en células HeLa, tampoco hay Sororina en cromatina (Nishiyama et al., 2010). Una explicación de este resultado es que la Sororina reconozca sólo complejos de Cohesina acetilados en Smc3. Sin embargo, Sororina inmunoprecipita con complejos Cohesina que contienen versiones no acetilables de Smc3

(Nishiyama et al., 2010). Experimentos en *Xenopus* muestran también que cuando la acetilación de Smc3 ocurre de forma independiente de la replicación, Sororina no se une a cromatina (Song et al., 2012, Lafont et al., 2010). Así, la acetilación es necesaria pero no suficiente para que la Sororina se una a cromatina. Sororina contiene motivos FGF similares a los que Wapl emplea para interactuar con Pds5 (Shintomi and Hirano, 2009, Nishiyama et al., 2010). Es posible que, a diferencia de Wapl, que interactúa no sólo con Pds5 sino también con la subunidad SA de Cohesina (Gandhi et al., 2006, Shintomi and Hirano, 2009), la unión de Sororina a Cohesina ocurra exclusivamente a través de Pds5. Esto podría explicar la importancia de Pds5 tanto en el establecimiento de la cohesión, al atraer a las acetiltransferasas de Cohesina, como en mantener la misma en G2 y mitosis, al ser necesario para que Sororina permanezca unido a Cohesina. Experimentos iniciales en levaduras con mutantes sensibles a temperatura muestran que la inactivación de Pds5 en células paradas en metafase provoca la pérdida de cohesión, lo que sugiere que la función de Pds5 es necesaria para mantener la cohesión, no sólo para establecerla, también en este organismo (Hartman et al., 2000, Panizza et al., 2000). Resultados recientes empleando proteínas fusionadas a un degrón que permite su destrucción a voluntad sugieren, sin embargo, que Pds5 sólo se requiere para establecer la cohesión durante fase S pero no para mantenerla (Kulemzina et al., 2012). Sería interesante realizar este tipo de experimentos en células de mamífero para corroborar nuestra hipótesis.

En cualquier caso, nuestros experimentos muestran que sólo cuando se eliminan Pds5A y Pds5B de forma simultánea es posible detectar la reducción en la unión de Sororina a cromatina. En cambio, la acetilación de Smc3 se ve afectada cuantitativamente de forma comparable cuando se elimina Pds5A sólo o Pds5B sólo. Esto sugiere, en primer lugar, que las proteínas Pds5 son necesarias para permitir el acceso de las acetiltransferasas Escp1 y Escp2 a la Cohesina presente en cromatina. Una propuesta similar se desprende de un estudio reciente en *S. pombe* (Vaur et al., 2012). Mediante la técnica de doble híbrido se ha detectado una interacción física entre Pds5 y Eso1 (Tanaka et al., 2001). En segundo lugar, quizá toda la Cohesina presente en cromatina es acetilada cuando se replica el ADN pero sólo una parte de la misma se une a Sororina y genera una Cohesina cohesiva. El exceso de Cohesina acetilada frente a Sororina explicaría la falta de efecto en la unión de Sororina en ausencia de sólo una de las proteínas Pds5. En el centrómero, la Cohesina parece asociarse preferentemente a Pds5B y Escp2 sería la acetiltransferasa encargada de acetilarla en esta región (Whelan et al., 2012). En concordancia con esta hipótesis, la cantidad de Escp2 que se detecta en los focos de heterocromatina disminuye claramente en los MEFs sin Pds5B. El resultado es una menor acetilación de Cohesina y una menor presencia de Sororina en la región pericentromérica. En

definitiva, la Cohesina no es cohesiva y de ahí los defectos de cohesión centromérica que se observan en los cromosomas metafásicos de los MEFs deficientes para Pds5B (Figura 44).

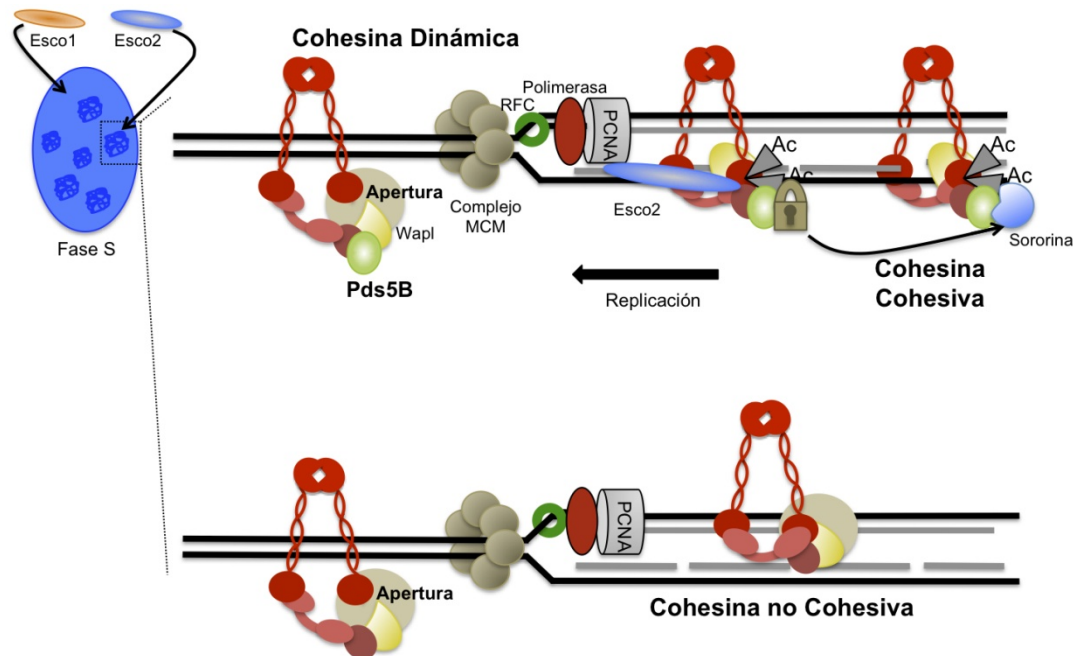


Figura 44. Papel de Pds5B en el establecimiento de la cohesión en la región centromérica. Durante fase S Esco2 se encarga de la acetilación de Smc3 en las regiones de heterocromatina pericentromérica (encuadrada). En la amplificación se muestra un modelo del proceso de establecimiento de la cohesión en la región pericentromérica en la que proponemos que Pds5B atrae a Esco2. Una vez acetilada, la Cohesina pierde su capacidad de abrirse y cerrarse a través de la región de Smc3 (candado) para convertirse finalmente en cohesiva tras la unión de Sororina. Este proceso se produciría de la misma manera en otras regiones cromosómicas con la participación de Esco1 y Pds5A.

Los problemas de cohesión centromérica descritos en este trabajo no son consecuencia del fenómeno bautizado con el nombre de “*cohesion fatigue*”. Este fenómeno tiene lugar en células que pasan mucho tiempo arrestadas en metafase con un huso mitótico funcional, lo que lleva a un desgaste progresivo de la cohesión hasta que se produce una separación de las cromátidas independientemente de la activación de la Separasa (Daum et al., 2011). Los experimentos de videomicroscopía de las células Pds5B^{-/-} no evidencian arresto en prometafase ni separación asincrónica de las cromátidas. De hecho, si bien el centrómero es la región del cromosoma donde la cohesión parece más necesaria pues debe soportar las fuerzas de los microtúbulos del huso, nuestro análisis demuestra que la célula es capaz de formar metafases con cromosomas carentes de esta cohesión (Figura 45). Es probable que la cohesión de los brazos, mediada por Cohesina unida a Pds5A, y la existencia de catenaciones a lo largos de brazos y centrómeros, y que deben ser resueltas por la topoisomerasa II, contribuyan a la

cohesión y permitan la progresión a través de mitosis en las células sin Pds5B. En levaduras mutantes para Swi6, el homólogo de HP1 en *S. pombe*, la Cohesina no se acumula en la región centrómerica y se observan defectos de cohesión en esta región. Estos mutantes son viables, aunque pierden cromosomas con una frecuencia mayor que las cepas de genotipo salvaje, gracias a la cohesión de los brazos (Bernard et al., 2001, Nonaka et al., 2002).

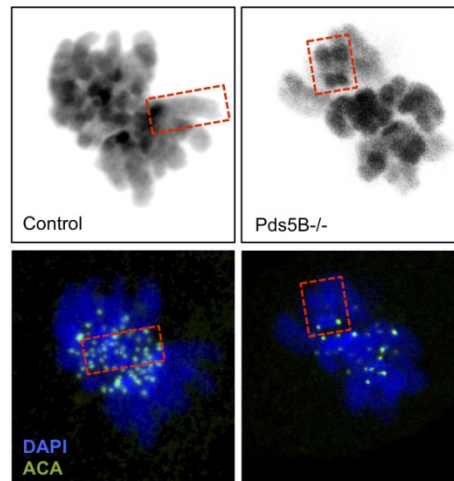


Figura 45. La falta de cohesión centromérica no impide la formación de la placa metafásica. Imágenes de microscopía confocal de metafases de MEFs primarios del genotipo indicado. El panel superior muestra los cromosomas teñidos con DAPI y el inferior los cromosomas (azul) y los centrómeros marcados con el anticuerpo ACA (verde). Las imágenes se tomaron en secciones a lo largo del eje Z y se analizaron para asegurar que las señales centroméricas correspondían al cromosoma indicado y se encontraban en el mismo plano focal. En rojo se enmarcan cromosomas representativos. Barra de escala, 4μm.

Las células deficientes en Esco2 o Pds5B presentan defectos de cohesión centromérica similares (Whelan et al., 2011). Sin embargo, sólo los cromosomas de las primeras tienen una morfología característica (“de raíles”) en la que los brazos cromosómicos están dispuestos en paralelo. Se ha propuesto que esto se debe a una mayor cohesión a lo largo de los mismos debido a la deslocalización de la quinasa Bub1 por defectos del cinetocoro, que a su vez dirige a Sgo1 a los brazos y así protege una fracción mayor de Cohesina (Whelan et al., 2011). Este no es el caso en las células deficientes en Pds5B en las que Bub1 aparece correctamente localizada en estas células. No sabemos cuál puede ser la causa de estas diferencias, aunque podemos especular con la posibilidad de que Esco2 acetile a otras proteínas, además de la Cohesina, cuya función sea importante para el ensamblaje y/o función del cinetocoro. Esto explicaría por qué los defectos de segregación cromosómica son mayores en las células deficientes en Esco2 cuando una mayor cohesión en los brazos debería contrarrestar mejor la pérdida de cohesión centromérica. La existencia de otras funciones de Esco2 podría también ser la razón por la que los embriones deficientes en Esco2 presentan una letalidad muy temprana, en tanto que los deficientes en Pds5B mueren poco antes de nacer. Es importante

recordar también que la deficiencia en Esco2 es compatible con la viabilidad en embriones humanos, si bien da lugar al síndrome de Roberts (Vega et al. 2005)

5. Segregación cromosómica y aneuploidía en ausencia de Pds5B

La biorientación de los cromosomas es un evento crucial durante la segregación en mitosis, pues asegura que cada una de las cromátidas hermanas del cromosoma viaje a un polo de la célula en división y sea por tanto heredada por una de las células hijas. Por ello, existe un punto de control (*spindle assembly checkpoint* o SAC) que comprueba que todos los cromosomas estén biorientados antes de desencadenar la anafase. La eficiencia del proceso de biorientación depende fundamentalmente de la cohesión centromérica y de la función correctora de Aurora B (Gay et al. 2012). La cohesión centromérica propicia una disposición “back-to-back” de los cinetocoros hermanos en mitosis (Sakuno et al. 2009; Gegan et al. 2011). En meiosis I, el complejo Monopolina debe corregir esta geometría para permitir que los dos cinetocoros hermanos de cada homólogo se unan al mismo polo (Monje-Casas et al., 2007). Por otro lado, la acción de Aurora B es fundamental para desestabilizar uniones erróneas o no productivas (revisado en Lampson y Cheeseman, 2011). En ausencia de tensión, Aurora B fosforila sustratos presentes en los cinetocoros para conseguir despolimerizar los MTs con uniones incorrectas y permitir la unión de otros para conseguir finalmente la biorientación de los cromosomas (Nezi and Musacchio, 2011).

En ausencia de Pds5B, el proceso de biorientación es ineficiente. Por un lado, no hay cohesión centromérica y por otro, la localización de Aurora B está alterada debido a que Haspin no se dirige a los centrómeros y no se acumula H3pT3, (Wang et al., 2010, Kelly et al., 2010)(Figura 46). Sin embargo, en los experimentos de videomicroscopía no se observa un retraso significativo en prometafase en las células sin Pds5B. En células con niveles bajos de Cohesina o de Shugosina (Sgo1, protector de la cohesión centromérica) se observa un retraso en prometafase que depende de Mad2 (Toyoda and Yanagida, 2006, McGuinness et al., 2005). Una diferencia importante con las células sin Pds5B es que la cohesión de los brazos también desaparece en aquéllas, pero no en éstas. Las Cohesinas que llevan Pds5A mantienen la cohesión de las regiones no centroméricas. Como se señala en un apartado anterior, es posible también que en ausencia de Pds5B la disociación de Cohesina de profase esté parcialmente afectada, aunque menos que en *Xenopus* (Shintomi and Hirano, 2009), de modo que haya un pequeño “exceso” de Cohesina (por debajo del nivel de detección con nuestros anticuerpos) en la región centromérica. Esta Cohesina sin Pds5B, a pesar de no ser cohesiva, podría entorpecer la labor de la topoisomerasa II e incrementar el número de catenaciones entre las cromátidas hermanas (Farcas et al., 2011, Wang et al., 2010), disminuyendo así la severidad

del fenotipo de las células Pds5B *knock out* en lo que se refiere a defectos en la segregación cromosómica.

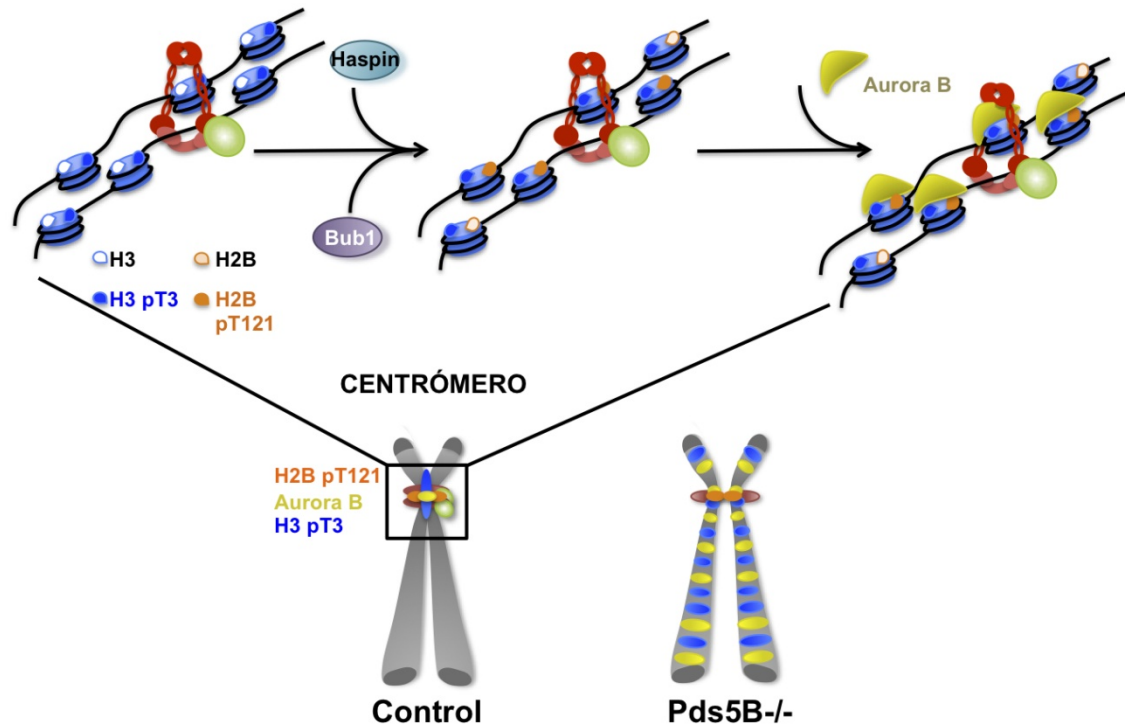


Figura 46. Papel de Pds5B en la localización de AuroraB en el centrómero. Representación esquemática del proceso que media la acumulación de Aurora B en la región centromérica, y que requiere las fosforilaciones de H2B y H3 al comienzo de la mitosis por Bub1 y Haspin, respectivamente. En la parte inferior se representa el resultado de la eliminación de Pds5B: Haspin no se localiza en la región centromérica con la consiguiente redistribución de la fosforilación de H3 y de Aurora B a lo largo de los brazos cromosómicos.

Por otro lado, la actividad residual de Aurora B entre los centrómeros hermanos de las células sin Pds5B podría ser suficiente para corregir las uniones sintéticas, a pesar de que seguramente sean más frecuentes que una célula control. También serán más frecuentes las uniones merotéticas, responsables de una buena parte de los problemas de segregación cromosómica observados en las células sin Pds5B, pero estas uniones no activan el SAC. Por otro lado, la deslocalización de Aurora B en las células sin Pds5B podría también debilitar el SAC, pues existen evidencias de que Aurora B facilita la localización de las proteínas del SAC en los cinetocoros (Ditchfield et al., 2003, Hauf et al., 2003, Santaguida et al., 2011).

Así, la principal consecuencia de la falta de Pds5B parece ser un incremento en las uniones merotéticas. El resultado es la aparición de cromosomas rezagados que se quedan entre las dos masas de cromátidas que viajan a polos opuestos en anafase. Estos cromosomas deberían constar de una sola cromátida si sólo uno de los cinetocoros está enganchado a los dos polos, o de dos cromátidas si los dos cinetocoros lo están, algo en principio menos frecuente. Resultados preliminares de la tinción de anafases provenientes de células con y sin Pds5B con anticuerpos que reconocen centrómeros (ACA) y telómeros (anti-TRF1) indican que,

mayoritariamente, los cromosomas rezagados constan de una sola cromátida. Esta cromátida puede dirigirse eventualmente hacia uno de los polos o formar un micronúcleo y generar o no células aneuploides, pero también puede provocar un fallo en citocinesis que tiene como resultado la formación de células binucleadas (Figura 47). Estas células, en la siguiente mitosis, formarán con alta probabilidad husos multipolares, que generarán a su vez problemas de segregación (revisado en Holland y Cleveland, 2012). Los micronúcleos, por otro lado, no replican su ADN de forma eficiente y si entran en la siguiente mitosis sin haber completado su replicación pueden causar también defectos de segregación, mutagénesis o pulverizarse (cromotripsis) (Crasta et al., 2012). Así pues, los defectos de segregación cromosómica que resultan del incremento en la frecuencia de uniones merotéticas podría explicar la aparición de aneuploidías en las células deficientes en Pds5B que observamos tanto *ex vivo* (en MEFs en cultivo) como *in vivo* en hepatocitos fetales.

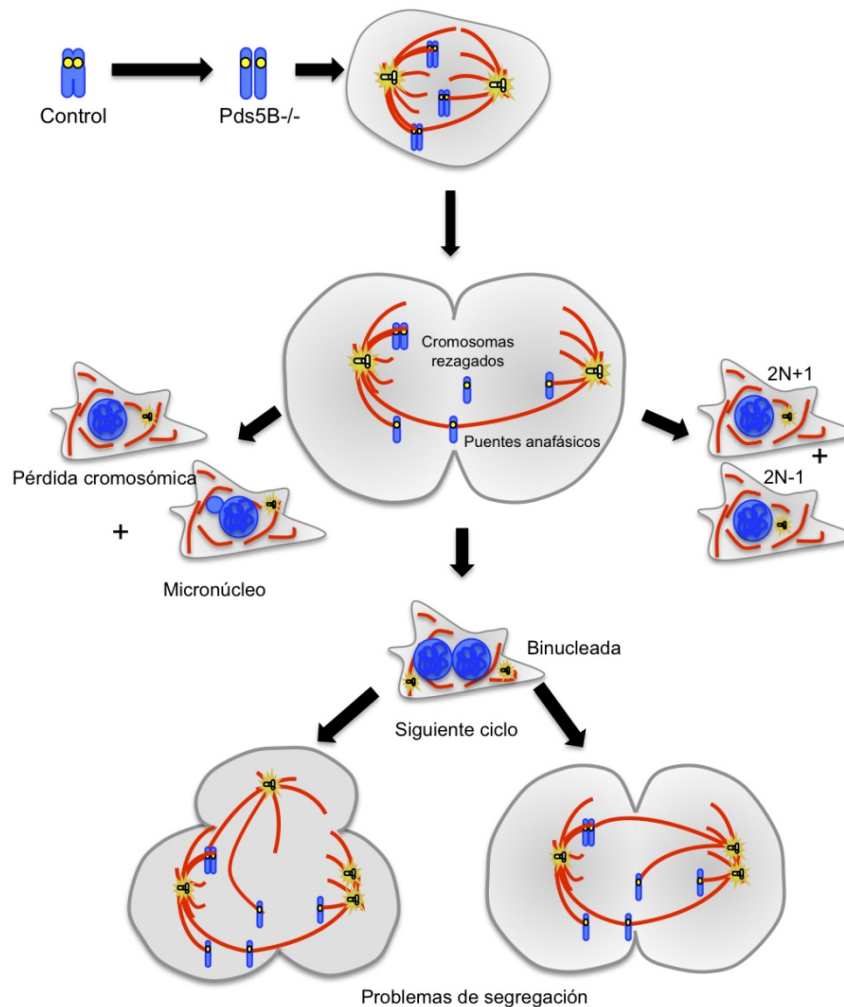


Figura 47. Mecanismos de generación de aneuploidía en ausencia de Pds5B. El defecto de cohesión centromérica en las células sin Pds5B dificulta el proceso de biorientación cromosómica y deja uniones erróneas entre MTs-cinetocoros. Estas uniones producen problemas de segregación en anafase que llevan a la formación de células hijas con dotaciones cromosómicas aberrantes.

6. Las consecuencias de la aneuploidía para el organismo

Las aneuploidías son, en general, incompatibles con el desarrollo embrionario en humanos. Todas las monosomías y 20 de las 23 trisomías autosómicas posibles son letales, en tanto que éstas últimas producen síndromes los síndromes de Patau (13), de Edwards (18) y de Down (21) (Williams and Amon, 2009). La infertilidad y el aumento del riesgo de dar a luz niños con enfermedades genéticas en mujeres añosas parece deberse a la pérdida progresiva de cohesión en sus oocitos, parados en meiosis II durante décadas (Jessberger, 2012). Sin embargo, alteraciones cariotípicas que implican tanto ganancia como pérdida de cromosomas son eventos frecuentes en tumores (Kops et al., 2005). De hecho, el 90% de los tumores sólidos son aneuploides (Mitelman et al., 2006). Varios modelos de ratón confirman también la relación existente entre problemas de segregación cromosómica, aneuploidías e incidencia de cáncer (Weaver et al., 2007, Jeganathan et al., 2007). Aunque las células aneuploides tienen una menor capacidad proliferativa que las células euploides, al menos en las placas de cultivo (Williams et al., 2008), poseen una mayor capacidad “evolutiva” para adaptarse a las condiciones de estrés en las que normalmente se desarrollan los tumores (revisado en Holland and Cleveland 2012).

Hasta hace poco, los datos que relacionaban que mutaciones en Cohesina con cáncer eran pocos y poco robustos (revisado en (Xu et al., 2011). Recientemente se han publicado dos estudios que establecen una unión entre Cohesina, aneuploidía y cáncer en humanos. Por un lado, Barber y colaboradores (Barber et al., 2008) identificaron una alta frecuencia de mutaciones en genes de Cohesina en muestras de tumores colorrectales, característicamente aneuploides. Por otro, Solomon y colaboradores (Solomon et al., 2011) han encontrado mutaciones que inactivan el gen que codifica a la subunidad de Cohesina SA2, presente en el cromosoma X, en varios tipos de tumores que incluyen glioblastoma, sarcoma de Ewin y melanoma. En ratones portadores de un alelo nulo del gen que codifica a SA1, hemos observado también una mayor incidencia de tumores a edades tempranas (Remeseiro et al., 2012a). De momento no está claro que el carácter tumorigénico de las mutaciones en Cohesina se deba exclusivamente al papel del complejo en cohesión pues su papel en regulación de la transcripción podría ser también relevante.

En el caso concreto de las proteínas Pds5, su relación con cáncer no ha sido de momento muy explorada. Se ha descrito una disminución en los niveles de Pds5A en tumores renales y de mama (Kumar et al. 2004) y un aumento en tumores del aparato digestivo (Zhang et al. 2008) y astrocíticos (Hagemann et al. 2011). También se han descrito mutaciones o reducción de los niveles de Pds5B en varios tipos de tumores o líneas celulares derivadas de los mismos, incluyendo tumores esofágicos (Harada 2001; Zhang 2008), cabeza y cuello (Reis

2005), cervicales (Seo et al. 2005) y de próstata (Murthy et al. 2005). El significado de estos cambios en términos de diagnóstico, pronóstico, evolución o tratamiento de los tumores en los que se han encontrado, se desconoce. Nuestro trabajo establece una relación directa entre la disregulación de la segregación cromosómica en ausencia Pds5B y la aparición de aneuploidía, por lo que resulta un modelo atractivo para indagar su potencial contribución a procesos de tumorigénesis. La pérdida de un solo alelo de Pds5B no parece suficiente para aumentar la incidencia de tumores en tanto que la pérdida de los dos alelos produce letalidad embrionaria. Sin embargo, puesto que hemos generado un alelo condicional, en el futuro será posible analizar las consecuencias de la pérdida de expresión de Pds5B en un tejido determinado en animales adultos.

Por otro lado, la eliminación específica de Pds5B en testículos u ovarios nos permitiría estudiar su papel en meiosis. Una vez eliminada la cohesión de los brazos para permitir la segregación de cromosomas homólogos en anafase de la primera división meiótica, la cohesión de las cromátidas hermanas se limita a la región centromérica, por lo que es muy posible que la segregación cromosómica en meiosis II se vea muy afectada en ausencia de Pds5B. Otros modelos animales que también presentan problemas de cohesión centromérica son estériles pues la división meiótica da lugar a gametos aneuploides inviables (Llano et al., 2008, Huang et al., 2007, Perera et al., 2007, Revenkova et al., 2004).

7. Últimos comentarios

Este trabajo supone la primera demostración clara de que la Cohesina unida a Pds5A o Pds5B lleva a cabo funciones específicas, al menos en lo que concierne a mediar cohesión en diferentes regiones cromosómicas. La diversificación de subunidades de Cohesina (Smc1, Scc1/Rad21 y Scc3/SA) y factores de cohesión (Pds5, acetiltransferasas, Shugosina) es especialmente notoria en meiosis, y en este caso existen variantes meióticas ya en levaduras. El significado evolutivo de la aparición de estas variantes no está claro. Aunque hubiera sido lógico pensar en la coevolución de algunas de estos factores, por ejemplo, SA1-Pds5A-Esco1 y SA2-Pds5B-Esco2, este no parece ser el caso. Por un lado, tanto Cohesina-SA1 como Cohesina-SA2 interactúan con Pds5A y Pds5B. En humanos y ratón, la Cohesina-SA2 es la principal responsable de la cohesión centromérica. ¿Sería de esperar un fenotipo similar, en términos de segregación cromosómica, en MEFs sin SA2 y MEFs sin Pds5B? De momento no hay un modelo deficiente en SA2 que nos permita contestar a esta pregunta. Tampoco parece claro que cada proteína Pds5 sea responsable de atraer a una de las acetiltransferasas, Esco1 y Esco2, aunque podría haber una cierta preferencia de Esco2 por Pds5B. Por un lado, estas dos proteínas son esenciales para la cohesión centromérica y los focos de heterocromatina de los

MEFs sin Pds5B presentan una reducción clara de Esco2. Por otro lado, Pds5B y Esco2 son más abundantes y responsables de la cohesión en extractos de *Xenopus* (Lafont et al., 2010, Losada et al., 2005). Curiosamente, en estos extractos, SA1 es claramente predominante sobre SA2, y capaz de llevar a cabo la cohesión centromérica (Losada et al., 2000). Un análisis detallado de las interacciones físicas entre estos factores, tanto en extractos celulares como usando proteínas recombinantes, experimentos de pérdida de función como los descritos en esta tesis pero con Esco1 y SA2, o tras la eliminación simultánea de dos factores y análisis funcionales usando proteínas quiméricas, son algunos de los experimentos que podrán ayudarnos a comprender la especificidad de cada una de estas variantes y su significado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La función de los factores de cohesión Pds5A y Pds5B es necesaria para completar correctamente el desarrollo embrionario. Los embriones que sobreviven hasta las últimas etapas del desarrollo muestran retraso en el crecimiento e hipoplasia generalizada que resulta más acusada cuando falta Pds5A.

2. La eliminación simultánea de Pds5A y Pds5B produce un aumento moderado pero significativo en la población de Cohesina presente en la cromatina interfásica, lo que sugiere que ambas contribuyen al comportamiento dinámico del complejo.

3. Las dos proteínas Pds5 contribuyen a la cohesión en telómeros y brazos, pero Pds5A parece tener un papel más importante que Pds5B en estas regiones.

4. Pds5B, pero no Pds5A, es esencial para la cohesión en la región centromérica.

5. Pds5A y Pds5B son necesarias para la acetilación de la Cohesina y la unión de Sororina. La acumulación de la acetil transferasa Esco2 en la región centromérica es menor en las células carentes de Pds5B y esto hace que se genere menos Cohesina cohesiva, esto es, unida a Sororina.

6. A pesar de los defectos de cohesión centromérica, las células sin Pds5B son capaces de formar una placa metafásica. Sin embargo, el proceso de biorientación es ineficiente y genera numerosas uniones merotéticas.

7. La función de Pds5B es necesaria para que Haspin fosforile la Treonina 3 de la histona H3 en la región centromérica y esto a su vez favorece la correcta localización de Aurora B, facilitando su acción correctora durante el proceso de biorientación.

8. Las células deficientes en Pds5B tienen defectos de segregación cromosómica y acumulan aneuploidías, no así las células deficientes en Pds5A.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones modificados genéticamente

1.1 Generación de los modelos animales

Las líneas de ratón condicionales para los factores de cohesión Pds5A y Pds5B se generaron usando el sistema de *gene targeting* mediado por recombinación homóloga. Los vectores empleados (descritos en la Figura 13) se linearizaron, se purificaron y se electroporaron en células madre embrionarias murinas de fondo genético 129Sv. Se seleccionaron los clones resistentes a neomicina y se buscaron clones positivos mediante PCR y posteriormente mediante *Southern blot*, usando sondas de las regiones a ambos lados del sitio de inserción. Los clones en los que la construcción se había integrado correctamente se agregaron o microinyectaron en blastocistos murinos C57BL/6J. Las quimeras obtenidas se cruzaron con animales de genotipo salvaje de fondo genético C57BL/6J para testar la transmisión de dichas quimeras y a partir de los animales portadores de la construcción obtenidos en esta primera generación se amplificó la colonia. Para Pds5A, Ozgene se encargó de todo el proceso, desde la construcción del vector hasta la producción de quimeras. Para Pds5B, el vector de *targeting* se construyó en nuestro laboratorio, Genoway se encargó de la recombinación homóloga en células ES y la búsqueda de clones positivos y las quimeras se generaron en la Unidad de Ratones Transgénicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Los animales de la primera generación procedentes de los portadores del alelo Pds5A (lox frt) o Pds5B (lox frt). Estos últimos se cruzaron con animales transgénicos portadores de la Flipasa para eliminar el casete de resistencia a neomicina y obtener así el alelo condicional (en adelante, Pds5B lox). Animales homocigotos Pds5B (lox/lox) se cruzaron con ratones transgénicos portadores de la recombinasa Cre expresada en todos los tejidos constitutivamente (CMV-Cre) para conseguir el alelo Pds5B (-). En el caso de la línea Pds5A los animales Pds5A loxfrt se cruzaron directamente con animales CMV-Cre, ya que el diseño del vector hacía posible la eliminación de toda la construcción en un solo paso.

1.2 Genotipado

El genotipado de los animales se llevó a cabo mediante PCR del ADN genómico obtenido de la lisis de un trozo de la cola de los ratones en tampón PCR-K (50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.5, 0.01% gelatina, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20, 100 µg/ml proteinasa K) durante 2 h a 55°C en agitación. Posteriormente se inactivó la proteinasa K a 95°C durante 15 min. La reacción de PCR se hizo con Taq polimerasa (Ecogen), 10 mM, MgCl₂, 2 mM dNTPs, 10 mM oligonucleótidos iniciadores, 2 µl de ADN genómico y tampón de la

enzima en un volumen final de 20 ml. El programa utilizado fue: 94°C 5 min.; 25x (94°C 30 seg.; 55°C 1 min.; 72°C 3 min.); 72°C 10min. Las secuencias de los oligonucleótidos son: oligo 1A 5' GGA CAC TTT AGC AGT TAC CTC AGC 3'; oligo 2A 5' ACC CTA AGT CCC AAT GCA CC 3'; oligo 3A 5' GGC GGA AAG AAC CAT CTA GC 3'; oligo 1B 5'GCC CTT CTT TCA TTG TTT AC 3'; oligo 2B 5'GGT TTG CAG AGA GTT CTA GC 3'. Los tamaños de las bandas de PCR correspondientes a los distintos alelos son: Pds5A (+), 872 pb; Pds5A (loxfrt), 778 pb; Pds5A (-), 414 pb; Pds5A (loxfrt), 1711 pb; Pds5B (+), 706 pb; Pds5B (lox), 859 bp; Pds5B (-), 415 pb.

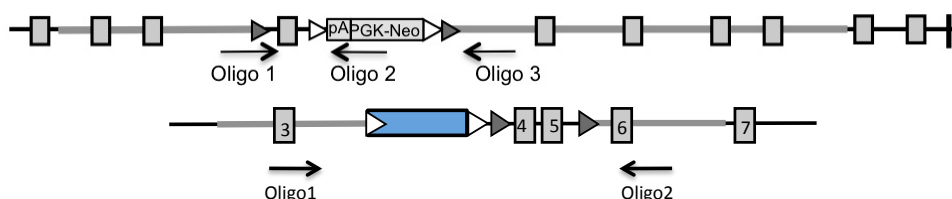


Figura 49. Representación esquemática de la posición relativa de los oligonucleótidos empleados para el genotipado. El panel superior muestra la estrategia usada en la línea Pds5A y en el de abajo la usada para Pds5B.

1.3 Histología

Los embriones se fijaron en 10% formalina (Sigma) durante 24 h. Para facilitar la fijación se les practicó una incisión poco profunda a lo largo de la columna vertebral. Tras la fijación se incluyeron en bloques de parafina. Se hicieron secciones de 3 a 5 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El análisis histopatológico descrito en esta tesis lo llevó a cabo Marta Cañamero, jefa de la Unidad de Patología Comparada del CNIO.

2. Cultivos y ensayos celulares

2. 1 Extracción y cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Los embriones a partir de los cuales se obtuvieron los MEFs utilizados en los experimentos descritos en esta tesis se extrajeron a 12,5 días postcoitales (dpc). Tras la eutanasia de las hembras preñadas mediante dislocación cervical se extrajeron los cuernos uterinos, se extrajeron los embriones en condiciones de esterilidad y se lavaron los embriones en PBS 1x suplementado con penicilina y estreptomomicina (S/P). Se cortó una pequeña parte de la cabeza para el genotipado y los cuerpos se machacaron con una cuchilla estéril, se resuspendieron en 1 ml de tripsina 1x (Sigma) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 20 min. El lisado se recogió con medio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) completo (Sigma/Lonza) (20% FBS, S/P, glutamato y 5mM de glucosa) y se pasó a placas de cultivo que se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta confluencia. Las células primarias usadas en los experimentos descritos en este trabajo no fueron en ningún caso de un pase mayor de 4.

2.2 Inmortalización de MEFs

Los MEFs primarios se inmortalizaron mediante infección con retrovirus portadores de la parte final del antígeno T largo de SV40, T121 y una resistencia a puomicina. Este tipo de estrategia produce la inmortalización por mutación del oncogén Ras pero no de p53. Los virus se produjeron en células 293T en las que se transfectó también un plásmido reportero para comprobar la eficiencia de las transfecciones (pGEX-H2BGFP) y el plásmido pCLEco portador de las secuencias necesarias para el encapsulamiento de los virus GAG-ENV-POL. Los sobrenadantes se recogieron 12 h después de la transfección. Los MEFs primarios en pases bajos (fase de crecimiento exponencial) se incubaron durante 6 h con el sobrenadante viral, se dejaron 12 h con medio completo y posteriormente se repitió la infección con un segundo sobrenadante. Las células infectadas se seleccionaron en 2mg/ml puomicina.

2.3 Curvas de proliferación

Para las curvas de proliferación se sembraron 6×10^5 células en placas multipocillo y se dejaron crecer durante seis días cambiándoles el medio días alternos. Cada día se contaron las células de uno de los pocillos.

2.4 Citometría

Se recogen 5×10^5 células, se lavan con PBS, se resuspenden en 300 μ l de PBS y se añaden 700 μ l de etanol 100%frío gota a gota agitando el tubo con el vortex a baja velocidad. Las células se dejan al menos 12 horas a 4 °C y antes del análisis se centrifugan y se resuspenden en PBS con 20 μ g/ml yoduro de propidio (Sigma) y 0.2 mg/ml ARNsa (Quiagen). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson) y se usó el programa FlowJo.

2.5 Análisis de la incorporación de BrdU

Para examinar la progresión por fase S se añadió al medio de cultivo 10 μ M BrdU y tras 40 min. las células creciendo sobre cubreobjetos se fijaron con 70% etanol frío durante 30 min. a 4°C. A continuación se incubaron en 0.5M HCl, 0.05% Tritón X100 para desnaturalizar el ADN y permeabilizar las células. Pasados 20 min. se neutralizó el ácido con 1M Tris-HCl pH 7.5 y las muestras se incubaron en 1% BSA en PBS-0.05%Tween con anti-BrdU marcado con FITC (BD Pharmingen) durante 20 min. en oscuridad. Se añadió 0.2mg/ml ARNsa A para eliminar el ARN y el ADN se tiñó el ADN con yoduro de propidio 20 mg/ml (Sigma).

2.6 siARN en MEFs

Se usaron siGENOME SMART pools (Dharmacon; M-054017-01 para Pds5A y M-058400-01 para Pds5B) que se transfectaron a 100 nM usando el sistema Neon (Invitrogen). Se

resuspendieron 10^6 células en tampón “R”, se recogieron con puntas recubiertas de oro y se sumergieron en el tampón electrolítico “E”. Se aplicaron dos pulsos de 20 mseg. a un voltaje de 1400V. Una vez transfectadas las células se sembraron en medio completo sin antibióticos y 72 horas más tarde se recogieron para examinar la eficiencia de la eliminación de la proteína correspondiente mediante western blot y para llevar a cabo los análisis pertinentes.

2.7 Hibridación *in situ* (FISH)

Se usaron como sondas BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) pertenecientes a una librería de ratón: subteloméro cromosoma 10 (RP23-71E10); brazo cromosoma 10 (RP23-453P21). Se hicieron minipreps de los BACs y se marcaron 0,5mg con Cy3 o FITC mediante *nick translation* usando un kit comercial (Abbott Inc). El ADN marcado se separó de los nucleótidos no incorporados en columnas de Quiagen, en un volumen de 100 ml, se mezcló con CotI murina y se precipitó con acetato sódico y etanol y se resuspendió en agua milliQ. Para la hibridación los portaobjetos con las células se incubaron a 90°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN, y después se deshidrataron mediante inmersión de 3 min. en soluciones de etanol de gradación creciente (70%,80%,100%). Las sondas, previamente diluidas en tampón Vysis LSI/WCP, se desnaturalizaron a 96°C durante 5 min. y se añadieron sobre los portas secos, cubriéndose con cubreobjetos. Tras 2 min. sobre una placa a 80°C, la hibridación se dejó toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron los portas con una solución de 0,4X SSC, 0,3% NP40 durante 2 min. a 75°C en un baño de agua. Después hizo un lavado con 2XSSC 0,1% NP40 durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación, y finalmente un lavado de 2 minutos en solución comercial PBD también a temperatura ambiente. Los portaobjetos se montaron con Vectashield con 1ug/ml de DAPI.

2.8 Preparación de esparcidos de cromosomas metafásicos

En el caso de MEFS, éstos se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200rpm durante 5min. Las células se resuspendieron en 75mM KCl y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un baño de agua (choque hipotónico). A continuación añadieron 3 gotas de solución Carnoy's (metanol:acético 3:1) y se centrifugaron 7 min. a 800rpm. El precipitados celulares se resuspendió en Carnoy's, y se repitió la centrifugación. Tras dos rondas de cambio de Carnoy's y centrifugación, se tiraron gotas sobre portaobjetos limpios, previamente humedecidos con ácido acético al 45%. Las preparaciones se dejaron secar durante toda una noche y se montaron con Vectashiel con 1ug/ml de DAPI. Para preparar esparcidos de hepatocitos embrionarios, se machacaron hígados de embriones de 14,5dpc con una cuchilla y se disgregaron con tripsina. Se añadió colcemida a una concentración de 0,1ug/ml durante 10 minutos y se siguió el protocolo detallado para los MEFs.

2.9 Preparación y tinción de cromosomas metafásicos mediante Citospin

Para la preparación de esparcidos de cromosomas mediante citospin, las células se lavaron con PBS y después se resuspendieron en 75 mM de KCl (que previamente había sido calentada a 37 °C). Se añadió la solución con KCl gota a gota resuspendiendo progresivamente las células y se incubaron a 37 °C durante 20 min. en un baño de agua. A continuación se cargaron las células en las cámaras del citospin (modelo Citospin 3 de Shandon), aprox. 10^5 células en 100 μ l. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. con la opción de aceleración y desaceleración lenta. Después de la centrifugación se incubaron las células con KCM (120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.7, 0.5 mM EDTA y 1 % Tritón X-100) al menos 10 min. A continuación se bloquearon con 3% BSA-KCM durante 30 min. Los anticuerpos primario y secundario, ambos diluidos en solución de bloqueo, se incubaron durante 1 h. Los lavados se hicieron con KCM. Finalmente las células se fijaron con 4 % PFA-KCM, se tiñeron los cromosomas con DAPI y se montaron con Vectashield (Vector).

2.10 Examen de las uniones MT-cinetocoro

Para desestabilizar los microtúbulos no cinetocóricos se hizo un tratamiento con calcio, aplicando sobre los cristales una solución 0.1mM CaCl_2 en 100mM PIPES, 1mM MgCl_2 y 0.1% Tritón X-100) (Mattiuzzo et al. 2011) durante 2 min. A continuación las células se fijaron con 4% PFA y se procesaron para inmunofluorescencia con anti-tubulina y ACA.

2.11 Inmunofluorescencia

Las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído (PFA)se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0.25 % Tritón X-100. Tras una incubación de 30 minutos en solución de bloqueo (3 % BSA en PBS, 0,05% Tween 20, 10% NDS [*Normal Donkey Serum*]), se añadieron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo y 1 hora después se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios a 1:200. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (Sigma) a una concentración 1 μ g/ml. Vectashield (Vector) fue usado como medio de montaje. Para aquellas muestras que requerían pre extracción se lavaron las células con PBS, con CSK (10 mM Pipes pH 7, 0.1 M NaCl, 0.3 M sacarosa y 3 mM MgCl_2) y a continuación se incubaron en CSK-0.5 % Tritón X-10-0.5 mM PMSF durante 4 min. Inmediatamente después se fijaron como se indica arriba. En los casos en los en los que la tinción posterior requería un paso de fijación con metanol, éste se hizo aplicando metanol frío durante 10 min. a -20°C sobre las células ya fijadas con PFA.

2.12 Microscopía y análisis de imagen

La adquisición de imágenes se llevó a cabo usando un microscopio LEICA con una cámara acoplada DFC-350-FX. Sólo en el caso del análisis de la unión MT- cinetocoros se usó un microscopio confocal de LEICA, modelo SP5-WLL. Se tomaron fotos en el plano Z cada 0.2µm usando el objetivo de 63 aumentos y 4X de zoom. Para el análisis de intensidades de Cohesina unida a cromatina todas las imágenes se adquirieron en las mismas condiciones y se cuantificaron las intensidades usando ImageJ o mediante *scripts* diseñados para cada experimento con el software *Definiens*.

2.13 Videomicroscopía

Para el seguimiento de la progresión a través de mitosis de células individuales, los MEFs primarios se cultivaron en medio sin suero y en condiciones de confluencia durante 72h. Pasado este tiempo se transfectaron con el plásmido pGEX-H2BmCherry usando el sistema Neon descrito anteriormente (4µg de plásmido por cada 10^6 de células) y se sembraron 4×10^5 células en cada pocillo de la placa de vídeo (Ibidi) en condiciones que estimulan la proliferación (60-70% confluencia y 20% de suero). La filmación se puso en marcha 16 h después en un microscopio DeltaVision RT (Applied Precision, LLC; IX70/71; Olympus) equipado con una cámara CollSNAP HQ (Roper Scientific). Las imágenes se adquirieron cada 5 minutos durante 24 h utilizando un objetivo de 40 aumentos. Para el análisis de los vídeos se usó el software LAS-AF Lite (Leica).

3. Ensayos bioquímicos

3.1 Fraccionamiento celular

Las células HeLa se cultivaron en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (Hyclone) y antibióticos (penicilina y estreptomycin) a 37°C y 5% CO₂. Para sincronizarlas células, 2×10^6 células se siembran en una placa p100 y a las 24h se añade medio nuevo con 2.5 mM timidina (Sigma) y se deja 20 h. En este punto la mayor parte de las células están bloqueadas en la transición G1/S. Si se retira el medio, se añade medio fresco y se deja que las células proliferen durante 4 h, se obtiene una población celular mayoritariamente en fase S. Si 9 h después de retirar la timidina se añade 50ng/ml de nocodazol y se deja 12 h, se obtiene una población enriquecida en mitosis. Para el fraccionamiento de cromatina se siguió el protocolo descrito en (Mendez and Stillman, 2000). Las células se resuspendieron en buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sacarosa y 10 % de glicerol) con 1 mM DTT e inhibidores de proteasas. Se añadió 0.1 % Tritón X-100 y se incubó 5min. en hielo. Se centrifugó a baja velocidad para separar los núcleos de la fracción citoplasmática. La

fracción que contiene los núcleos se trató con buffer B (3 mM EDTA y 0.2 mM EGTA) con 1 mM DTT y más inhibidores de proteasas durante 30 minutos en hielo. Se centrifugó de nuevo para separar la fracción que contiene el nucleoplasma y la fracción que contiene proteínas unidas a cromatina. Cantidades proporcionales de todas las fracciones se analizan mediante SDS-PAGE e inmunoblot. Como control del fraccionamiento se analizan MEK2, una proteína citoplasmática que sólo aparece en la fracción S2, y la histona H3 que debe aparecer en la fracción de cromatina, P3.

3.2 Western blot

Las fracciones proteicas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda. Las membranas se lavaron con TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) y se incubaron durante 1 h en solución de bloqueo (5 % leche en polvo en TBST). El anticuerpo primario se suministró diluido en 1 % BSA y TBST, mientras que el anticuerpo secundario con actividad peroxidasa (HRP, de Amersham Biosciences) se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo. Después de la incubación con cada anticuerpo se hicieron lavados con TBST. Tras la incubación con los anticuerpos las membranas se trataron con solución de detección ECL (Amersham Biosciences).

3.3 Inmunoprecipitación

Entre 80-100 ml de extracto nuclear de células HeLa (preparado en buffer B, como se describe en Losada et al. 2000) en se incuban con 2-5 mg de anticuerpo en hielo durante 2 h. Se añaden 10-15 30 µl de bolas de agarosa recubiertas de Proteína A y se incuba a 4°C en rotación continua durante 1-2h. El sobrenadante se recupera tras centrifugación (*flowthrough*) y las bolas se lavan varias veces con buffer B (el mismo en que está preparado el extracto), se resuspenden en solución de Laemmli para su análisis por SDS-PAGE y western blot. Como control de la inmunoprecipitación se utilizan Ig Gs preinmunes de conejo.

3.4 Cuantificación de mARNs de Pds5A y Pds5B en células y tejidos murinos.

Se extrajo ARN total de células y tejidos murinos con RNeasy (Qiagen) y se obtuvo cADN por transcripción reversa con Superscript II (Invitrogen). Para cuantificar de forma absoluta la cantidad de mARN de Pds5A y Pds5B mediante PCR cuantitativa se construyó una recta patrón con cADNs que corresponden a un fragmento de cada proteína (desde 0.00015 ng hasta 1.5 ng). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación fueron:

Pds5A: 5' ATCCAAAAGCCAGACGAGAA 3' / 5' AGCTCTTTTCCTTCCCTTGC 3'

Pds5B: 5' GGCCGTACAGCTTCAGACTC 3' / 5' TTTTCATTGTGGGCTCTCC 3'

Para la PCR cuantitativa se usó SybrGreen Master Mix que incluye ya la enzima para la amplificación y los dNTPS y las reacciones se hacen por triplicado para de cada muestra.

Tabla 1. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Aplicación	Origen
Scc1	WB	Losada et al. 1998
Smc1	WB/ChIP/IP	Losada Lab.
Smc3	IF	Losada et al. 1998
Smc3Ac	WB	Nishiyama et al. 2010
Pds5A	WB/IF/IP	Losada et al.,2005
Pds5B	WB/IP	Losada et al.,2005
Pds5B	IF	Bethyl
Sororina	IF/WB	Losada Lab
Wapl	WB/IF	Bethyl
Esco2	WB	Bethyl
Esco2	IF	Whelan et al., 2012
Bub1	IF	Perera & Taylor, 2010
PCNA	IF	Santa Cruz
Aurora B	IF	BD Transduction Lab.
ACA	IF	Antibodies Incorporated
Pericentrina	IF	Covance
alpha tubulina	IF/WB	Sigma
alpha tubulina	IF	ATCC/YL1/2
MEK2	WB	BD Transduction Lab.
BrdU-FITC	IF/FACs	BD Bioscience
H3	WB	Abcam (1791)
H3pThr3	IF	Millipore
H3pSer10	IF	Abcam (14955)

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, D. E., LOSADA, A., ERICKSON, H. P. & HIRANO, T. (2002) Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol*, 156, 419-24.
- ARUMUGAM, P., GRUBER, S., TANAKA, K., HAERING, C. H., MECHTLER, K. & NASMYTH, K. (2003) ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol*, 13, 1941-53.
- BARBER, T. D., MCMANUS, K., YUEN, K. W., REIS, M., PARMIGIANI, G., SHEN, D., BARRETT, I., NOUHI, Y., SPENCER, F., MARKOWITZ, S., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., LENGAUER, C. & HIETER, P. (2008) Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3443-8.
- BAXTER, J., SEN, N., MARTINEZ, V. L., DE CARANDINI, M. E., SCHVARTZMAN, J. B., DIFFLEY, J. F. & ARAGON, L. (2011) Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science*, 331, 1328-32.
- BERMUDEZ-LOPEZ, M., CESCHIA, A., DE PICCOLI, G., COLOMINA, N., PASERO, P., ARAGON, L. & TORRES-ROSELL, J. (2010) The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages. *Nucleic Acids Res*, 38, 6502-12.
- BERNARD, P., DROGAT, J., MAURE, J. F., DHEUR, S., VAUR, S., GENIER, S. & JAVERZAT, J. P. (2006) A screen for cohesion mutants uncovers Ssl3, the fission yeast counterpart of the cohesin loading factor Scc4. *Curr Biol*, 16, 875-81.
- BERNARD, P., MAURE, J. F., PARTRIDGE, J. F., GENIER, S., JAVERZAT, J. P. & ALLSHIRE, R. C. (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, 294, 2539-42.
- BROUGH, R., BAJRAMI, I., VATCHEVA, R., NATRAJAN, R., REIS-FILHO, J. S., LORD, C. J. & ASHWORTH, A. (2012) APRIN is a cell cycle specific BRCA2-interacting protein required for genome integrity and a predictor of outcome after chemotherapy in breast cancer. *Embo J*, 31, 1160-76.
- CANUDAS, S., HOUGHTALING, B. R., KIM, J. Y., DYNEK, J. N., CHANG, W. G. & SMITH, S. (2007) Protein requirements for sister telomere association in human cells. *Embo J*, 26, 4867-78.

- CANUDAS, S. & SMITH, S. (2009) Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J Cell Biol*, 187, 165-73.
- CASTRONOVO, P., GERVASINI, C., CEREDA, A., MASCIADRI, M., MILANI, D., RUSSO, S., SELICORNI, A. & LARIZZA, L. (2009) Premature chromatid separation is not a useful diagnostic marker for Cornelia de Lange syndrome. *Chromosome Res*, 17, 763-71.
- CHAN Y.W., JEYAPRAKASH A.A., NIGG E.A., SANTAMARIA A. (2012) Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction. *J Cell Biol*. 196, 563-571.
- CHANG, C. R., WU, C. S., HOM, Y. & GARTENBERG, M. R. (2005) Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. *Genes Dev*, 19, 3031-42.
- CHIEN, R., ZENG, W., KAWAUCHI, S., BENDER, M. A., SANTOS, R., GREGSON, H. C., SCHMIESING, J. A., NEWKIRK, D. A., KONG, X., BALL, A. R., JR., CALOF, A. L., LANDER, A. D., GROUDINE, M. T. & YOKOMORI, K. (2011) Cohesin mediates chromatin interactions that regulate mammalian beta-globin expression. *J Biol Chem*, 286, 17870-8.
- CLUTE, P. & PINES, J. (1999) Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol*, 1, 82-7.
- CRASTA, K., GANEM, N. J., DAGHER, R., LANTERMANN, A. B., IVANOVA, E. V., PAN, Y., NEZI, L., PROTOPOPOV, A., CHOWDHURY, D. & PELLMAN, D. (2012) DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, 482, 53-8.
- DAI, J., SULLIVAN, B. A. & HIGGINS, J. M. (2006) Regulation of mitotic chromosome cohesion by haspin and aurora B. *Dev Cell*, 11, 741-50.
- DAUM, J. R., POTAPOVA, T. A., SIVAKUMAR, S., DANIEL, J. J., FLYNN, J. N., RANKIN, S. & GORBSKY, G. J. (2011) Cohesion fatigue induces chromatid separation in cells delayed at metaphase. *Curr Biol*, 21, 1018-24.
- DEARDORFF, M. A., KAUR, M., YAEGER, D., RAMPURIA, A., KOROLEV, S., PIE, J., GIL-RODRIGUEZ, C., ARNEDO, M., LOEYS, B., KLINE, A. D., WILSON, M., LILLQUIST, K., SIU, V., RAMOS, F. J., MUSIO, A., JACKSON, L. S., DORSETT, D. & KRANTZ, I. D. (2007) Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *Am J Hum Genet*, 80, 485-94.
- DEGNER, S. C., WONG, T. P., JANKEVICIUS, G. & FEENEY, A. J. (2009) Cutting edge: developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J Immunol*, 182, 44-8.

- DENES, V., PILICHOWSKA, M., MAKAROVSKIY, A., CARPINITO, G. & GECK, P. (2010) Loss of a cohesin-linked suppressor APRIN (Pds5b) disrupts stem cell programs in embryonal carcinoma: an emerging cohesin role in tumor suppression. *Oncogene*, 29, 3446-52.
- DENISON, S. H., KAHER, E. & MAY, G. S. (1993) Mutation in the bimD gene of *Aspergillus nidulans* confers a conditional mitotic block and sensitivity to DNA damaging agents. *Genetics*, 134, 1085-96.
- DITCHFIELD, C., JOHNSON, V. L., TIGHE, A., ELLSTON, R., HAWORTH, C., JOHNSON, T., MORTLOCK, A., KEEN, N. & TAYLOR, S. S. (2003) Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, 161, 267-80.
- DORSETT, D., EISSENBERG, J. C., MISULOVIN, Z., MARTENS, A., REDDING, B. & MCKIM, K. (2005) Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in *Drosophila*. *Development*, 132, 4743-53.
- DRAETTA, G., LUCA, F., WESTENDORF, J., BRIZUELA, L., RUDERMAN, J. & BEACH, D. (1989) Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, 56, 829-38.
- DREIER, M. R., BEKIER, M. E., 2ND & TAYLOR, W. R. (2011) Regulation of sororin by Cdk1-mediated phosphorylation. *J Cell Sci*, 124, 2976-87.
- FARCAS, A. M., ULUOCAK, P., HELMHART, W. & NASMYTH, K. (2011) Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwining. *Mol Cell*, 44, 97-107.
- FEYTOUT, A., VAUR, S., GENIER, S., VAZQUEZ, S. & JAVERZAT, J. P. (2011) Psm3 acetylation on conserved lysine residues is dispensable for viability in fission yeast but contributes to Eso1-mediated sister chromatid cohesion by antagonizing Wpl1. *Mol Cell Biol*, 31, 1771-86.
- FURUYA, K., TAKAHASHI, K. & YANAGIDA, M. (1998) Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev*, 12, 3408-18.
- GANDHI, R., GILLESPIE, P. J. & HIRANO, T. (2006) Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Current Biology*, 16, 2406-17.
- GANEM, N. J., STORCHOVA, Z. & PELLMAN, D. (2007) Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 157-62.
- GAY G., COURTHEOUX T., REYES C., TOURNIER S., GACHET Y. (2012) A stochastic model of kinetochore-microtubule attachment accurately describes fission yeast chromosome segregation. *J Cell Biol* 19 196, 757-774.

- GAUSE, M., MISULOVIN, Z., BILYEU, A. & DORSETT, D. (2010) Dosage-sensitive regulation of cohesin chromosome binding and dynamics by Nipped-B, Pds5, and Wapl. *Mol Cell Biol*, 30, 4940-51.
- GECK, P., SZELEI, J., JIMENEZ, J., SONNENSCHNEIN, C. & SOTO, A. M. (1999) Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostate cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 68, 41-50.
- GERLICH, D., KOCH, B., DUPEUX, F., PETERS, J. M. & ELLENBERG, J. (2006) Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol*, 16, 1571-8.
- GILLESPIE, P. J. & HIRANO, T. (2004) Scc2 couples replication licensing to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol*, 14, 1598-603.
- GILSON, E. & GELI, V. (2007) How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 825-38.
- GIMENEZ-ABIAN, J. F., SUMARA, I., HIROTA, T., HAUF, S., GERLICH, D., DE LA TORRE, C., ELLENBERG, J. & PETERS, J. M. (2004) Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol*, 14, 1187-93.
- GLYNN, E. F., MEGEE, P. C., YU, H. G., MISTROT, C., UNAL, E., KOSHLAND, D. E., DERISI, J. L. & GERTON, J. L. (2004) Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol*, 2, E259.
- GORDILLO, M., VEGA, H., TRAINER, A. H., HOU, F., SAKAI, N., LUQUE, R., KAYSERILI, H., BASARAN, S., SKOVBY, F., HENNEKAM, R. C., UZIELLI, M. L., SCHNUR, R. E., MANOUVRIER, S., CHANG, S., BLAIR, E., HURST, J. A., FORZANO, F., MEINS, M., SIMOLA, K. O., RAAS-ROTHSCHILD, A., SCHULTZ, R. A., MCDANIEL, L. D., OZONO, K., INUI, K., ZOU, H. & JABS, E. W. (2008) The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. *Hum Mol Genet*, 17, 2172-80.
- GRUBER, S., ARUMUGAM, P., KATOU, Y., KUGLITSCH, D., HELMHART, W., SHIRAHIGE, K. & NASMYTH, K. (2006) Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell*, 127, 523-37.
- GRUBER, S., HAERING, C. H. & NASMYTH, K. (2003) Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell*, 112, 765-77.
- GUACCI, V. & KOSHLAND, D. (2012) Cohesin-independent segregation of sister chromatids in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 23, 729-39.

- GUACCI, V., KOSHLAND, D. & STRUNNIKOV, A. (1997) A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*, 91, 47-57.
- GUILLOU, E., IBARRA, A., COULON, V., CASADO-VELA, J., RICO, D., CASAL, I., SCHWOB, E., LOSADA, A. & MENDEZ, J. (2010) Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. *Genes Dev*, 24, 2812-22.
- HADJUR, S., WILLIAMS, L. M., RYAN, N. K., COBB, B. S., SEXTON, T., FRASER, P., FISHER, A. G. & MERKENSCHLAGER, M. (2009) Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. *Nature*, 460, 410-3.
- HAERING, C. H., FARCAS, A. M., ARUMUGAM, P., METSON, J. & NASMYTH, K. (2008) The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature*, 454, 297-301.
- HAERING, C. H., LOWE, J., HOCHWAGEN, A. & NASMYTH, K. (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell*, 9, 773-88.
- HAERING, C. H., SCHOFFNEGGER, D., NISHINO, T., HELMHART, W., NASMYTH, K. & LOWE, J. (2004) Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell*, 15, 951-64.
- HAGEMANN C., WEIGELIN B., SCHOMMER S., SCHULZE M., AL-JOMAH N., ANACKER J., GERNGRAS S., KÜHNEL S., KESSLER A.F., POLAT B., ERNESTUS R.I., PATEL R., VINCE G.H.(2011). The cohesin-interacting protein, precocious dissociation of sisters 5A/sister chromatid cohesion protein 112, is up-regulated in human astrocytic tumors. *Int J Mol Med*. (1):39-51.
- HALLSON, G., SYRZYCKA, M., BECK, S. A., KENNISON, J. A., DORSETT, D., PAGE, S. L., HUNTER, S. M., KEALL, R., WARREN, W. D., BROCK, H. W., SINCLAIR, D. A. & HONDA, B. M. (2008) The *Drosophila* cohesin subunit Rad21 is a trithorax group (trxG) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 12405-10.
- HARTMAN, T., STEAD, K., KOSHLAND, D. & GUACCI, V. (2000) Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 151, 613-26.
- HAUF, S., COLE, R. W., LATERRA, S., ZIMMER, C., SCHNAPP, G., WALTER, R., HECKEL, A., VAN MEEL, J., RIEDER, C. L. & PETERS, J. M. (2003) The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, 161, 281-94.
- HAUF, S., ROITINGER, E., KOCH, B., DITTRICH, C. M., MECHTLER, K. & PETERS, J. M. (2005) Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol*, 3, e69.

- HAUF, S., WAIZENEGGER, I. C. & PETERS, J. M. (2001) Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*, 293, 1320-3.
- HEIDINGER-PAULI, J. M., UNAL, E., GUACCI, V. & KOSHLAND, D. (2008) The kleisin subunit of cohesin dictates damage-induced cohesion. *Mol Cell*, 31, 47-56.
- HIGASHI, T. L., IKEDA, M., TANAKA, H., NAKAGAWA, T., BANDO, M., SHIRAHIGE, K., KUBOTA, Y., TAKISAWA, H., MASUKATA, H. & TAKAHASHI, T. S. (2012) The Prereplication Complex Recruits XEco2 to Chromatin to Promote Cohesin Acetylation in Xenopus Egg Extracts. *Curr Biol*, 22, 977-88.
- HIRANO, T. (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 311-22.
- HOLLAND A.J., CLEVELAND D.W.(2012) Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep*. 13, 501-514.
- HOLT, C. L. & MAY, G. S. (1996) An extragenic suppressor of the mitosis-defective bimD6 mutation of *Aspergillus nidulans* codes for a chromosome scaffold protein. *Genetics*, 142, 777-87.
- HORSFIELD, J. A., ANAGNOSTOU, S. H., HU, J. K., CHO, K. H., GEISLER, R., LIESCHKE, G., CROSIER, K. E. & CROSIER, P. S. (2007) Cohesin-dependent regulation of Runx genes. *Development*, 134, 2639-49.
- HOU, C., DALE, R. & DEAN, A. (2010) Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3651-6.
- HOU, F., CHU, C. W., KONG, X., YOKOMORI, K. & ZOU, H. (2007) The acetyltransferase activity of San stabilizes the mitotic cohesin at the centromeres in a shugoshin-independent manner. *J Cell Biol*, 177, 587-97.
- HU, B., ITOH, T., MISHRA, A., KATOH, Y., CHAN, K. L., UPCHER, W., GODLEE, C., ROIG, M. B., SHIRAHIGE, K. & NASMYTH, K. (2011) ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr Biol*, 21, 12-24.
- HUANG, H., FENG, J., FAMULSKI, J., RATTNER, J. B., LIU, S. T., KAO, G. D., MUSCHEL, R., CHAN, G. K. & YEN, T. J. (2007) Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol*, 177, 413-24.
- IVANOV, D. & NASMYTH, K. (2005) A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell*, 122, 849-60.
- JEGANATHAN, K., MALUREANU, L., BAKER, D. J., ABRAHAM, S. C. & VAN DEURSEN, J. M. (2007) Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol*, 179, 255-67.

- JESSBERGER, R. (2012) Age-related aneuploidy through cohesion exhaustion. *EMBO Rep*, 13, 539-46.
- KAGEY, M. H., NEWMAN, J. J., BILODEAU, S., ZHAN, Y., ORLANDO, D. A., VAN BERKUM, N. L., EBMEIER, C. C., GOOSSENS, J., RAHL, P. B., LEVINE, S. S., TAATJES, D. J., DEKKER, J. & YOUNG, R. A. (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467, 430-5.
- KAWASHIMA, S. A., YAMAGISHI, Y., HONDA, T., ISHIGURO, K. & WATANABE, Y. (2010) Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science*, 327, 172-7.
- KAWAUCHI, S., CALOF, A. L., SANTOS, R., LOPEZ-BURKS, M. E., YOUNG, C. M., HOANG, M. P., CHUA, A., LAO, T., LECHNER, M. S., DANIEL, J. A., NUSSENZWEIG, A., KITZES, L., YOKOMORI, K., HALLGRIMSSON, B. & LANDER, A. D. (2009) Multiple organ system defects and transcriptional dysregulation in the Nipbl(+/-) mouse, a model of Cornelia de Lange Syndrome. *PLoS Genet*, 5, e1000650.
- KEGEL, A., BETTS-LINDROOS, H., KANNO, T., JEPPSSON, K., STROM, L., KATOU, Y., ITOH, T., SHIRAHIGE, K. & SJOGREN, C. (2011) Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature*, 471, 392-6.
- KELLY, A. E., GHENOIU, C., XUE, J. Z., ZIERHUT, C., KIMURA, H. & FUNABIKI, H. (2010) Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science*, 330, 235-9.
- KIM, S. T., XU, B. & KASTAN, M. B. (2002) Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev*, 16, 560-70.
- KITAJIMA, T. S., HAUF, S., OHSUGI, M., YAMAMOTO, T. & WATANABE, Y. (2005) Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol*, 15, 353-9.
- KITAJIMA, T. S., SAKUNO, T., ISHIGURO, K., IEMURA, S., NATSUME, T., KAWASHIMA, S. A. & WATANABE, Y. (2006) Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*, 441, 46-52.
- KOCH, B., KUENG, S., RUCKENBAUER, C., WENDT, K. S. & PETERS, J. M. (2008) The Suv39h-HP1 histone methylation pathway is dispensable for enrichment and protection of cohesin at centromeres in mammalian cells. *Chromosoma*, 117, 199-210.
- KOPS, G. J. (2009) Dividing the goods: co-ordination of chromosome biorientation and mitotic checkpoint signalling by mitotic kinases. *Biochem Soc Trans*, 37, 971-5.
- KOPS, G. J., WEAVER, B. A. & CLEVELAND, D. W. (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*, 5, 773-85.

- KRANTZ, I. D., MCCALLUM, J., DESCIPIO, C., KAUR, M., GILLIS, L. A., YAEGER, D., JUKOFSKY, L., WASSERMAN, N., BOTTANI, A., MORRIS, C. A., NOWACZYK, M. J., TORIELLO, H., BAMSHAD, M. J., CAREY, J. C., RAPPAPORT, E., KAWAUCHI, S., LANDER, A. D., CALOF, A. L., LI, H. H., DEVOTO, M. & JACKSON, L. G. (2004) Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet*, 36, 631-5.
- KUENG, S., HEGEMANN, B., PETERS, B. H., LIPP, J. J., SCHLEIFFER, A., MECHTLER, K. & PETERS, J. M. (2006) Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell*, 127, 955-67.
- KULEMZINA, I., SCHUMACHER, M. R., VERMA, V., REITER, J., METZLER, J., FAILLA, A. V., LANZ, C., SREEDHARAN, V. T., RATSCH, G. & IVANOV, D. (2012) Cohesin rings devoid of scc3 and pds5 maintain their stable association with the DNA. *PLoS Genet*, 8, e1002856.
- KUMAR D., SAKABE I., PATEL S., ZHANG Y., AHMAD I., GEHAN E.A., WHITESIDE T.L., KASID U. (2004) . SCC-112, a novel cell cycle-regulated molecule, exhibits reduced expression in human renal carcinomas. *Gene*. 328, 187-196.
- LAFONT, A. L., SONG, J. & RANKIN, S. (2010) Sororin cooperates with the acetyltransferase Eco2 to ensure DNA replication-dependent sister chromatid cohesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20364-9.
- LAMPSON M.A., CHEESEMAN I.M. (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol*. 21(3):133-140.
- LENGRONNE, A., KATOU, Y., MORI, S., YOKOBAYASHI, S., KELLY, G. P., ITOH, T., WATANABE, Y., SHIRAHIGE, K. & UHLMANN, F. (2004) Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature*, 430, 573-8.
- LENGRONNE, A., MCINTYRE, J., KATOU, Y., KANO, Y., HOPFNER, K. P., SHIRAHIGE, K. & UHLMANN, F. (2006) Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell*, 23, 787-99.
- LIN, W., JIN, H., LIU, X., HAMPTON, K. & YU, H. G. (2011) Scc2 regulates gene expression by recruiting cohesin to the chromosome as a transcriptional activator during yeast meiosis. *Mol Biol Cell*, 22, 1985-96.
- LIU, J. & KRANTZ, I. D. (2008) Cohesin and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 303-20.
- LIU, J. & KRANTZ, I. D. (2009) Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clin Genet*, 76, 303-14.
- LIU, J., ZHANG, Z., BANDO, M., ITOH, T., DEARDORFF, M. A., CLARK, D., KAUR, M., TANDY, S., KONDOH, T., RAPPAPORT, E., SPINNER, N. B., VEGA, H., JACKSON, L. G., SHIRAHIGE, K.

- & KRANTZ, I. D. (2009) Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells. *PLoS Biol*, 7, e1000119.
- LLANO, E., GOMEZ, R., GUTIERREZ-CABALLERO, C., HERRAN, Y., SANCHEZ-MARTIN, M., VAZQUEZ-QUINONES, L., HERNANDEZ, T., DE ALAVA, E., CUADRADO, A., BARBERO, J. L., SUJA, J. A. & PENDAS, A. M. (2008) Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev*, 22, 2400-13.
- LOSADA, A., HIRANO, M. & HIRANO, T. (2002) Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev*, 16, 3004-16.
- LOSADA, A. & HIRANO, T. (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev*, 19, 1269-87.
- LOSADA, A., YOKOCHI, T. & HIRANO, T. (2005) Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci*, 118, 2133-41.
- LOSADA, A., YOKOCHI, T., KOBAYASHI, R. & HIRANO, T. (2000) Identification and characterization of SA/Scp3 subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol*, 150, 405-16.
- LUO, H., LI, Y., MU, J. J., ZHANG, J., TONAKA, T., HAMAMORI, Y., JUNG, S. Y., WANG, Y. & QIN, J. (2008) Regulation of intra-S phase checkpoint by ionizing radiation (IR)-dependent and IR-independent phosphorylation of SMC3. *J Biol Chem*, 283, 19176-83.
- LYONS, N. A. & MORGAN, D. O. (2011) Cdk1-dependent destruction of Eco1 prevents cohesion establishment after S phase. *Mol Cell*, 42, 378-89.
- MAFFINI, M., DENES, V., SONNENSCHNIG, C., SOTO, A. & GECK, P. (2008) APRIN is a unique Pds5 paralog with features of a chromatin regulator in hormonal differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108, 32-43.
- MANCHADO, E., GUILLAMOT, M., DE CARCER, G., EGUREN, M., TRICKEY, M., GARCIA-HIGUERA, I., MORENO, S., YAMANO, H., CANAMERO, M. & MALUMBRES, M. (2010) Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mst1, and the PP2A/B55alpha,delta phosphatase. *Cancer Cell*, 18, 641-54.
- MANNINI, L., LIU, J., KRANTZ, I. D. & MUSIO, A. (2010) Spectrum and consequences of SMC1A mutations: the unexpected involvement of a core component of cohesin in human disease. *Hum Mutat*, 31, 5-10.
- MCGUINNESS, B. E., HIROTA, T., KUDO, N. R., PETERS, J. M. & NASMYTH, K. (2005) Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol*, 3, e86.

- MENDEZ, J. & STILLMAN, B. (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol*, 20, 8602-12.
- MICHAELIS, C., CIOSK, R. & NASMYTH, K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91, 35-45.
- MILUTINOVICH, M., UNAL, E., WARD, C., SKIBBENS, R. V. & KOSHLAND, D. (2007) A Multi-Step Pathway for the Establishment of Sister Chromatid Cohesion. *PLoS Genet*, 3, e12.
- MISHIRO, T., ISHIHARA, K., HINO, S., TSUTSUMI, S., ABURATANI, H., SHIRAHIGE, K., KINOSHITA, Y. & NAKAO, M. (2009) Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster. *Embo J*, 28, 1234-45.
- MONJE-CASAS, F., PRABHU, V. R., LEE, B. H., BOSELLI, M. & AMON, A. (2007) Kinetochore orientation during meiosis is controlled by Aurora B and the monopolin complex. *Cell*, 128, 477-90.
- MONNICH, M., KURIGER, Z., PRINT, C. G. & HORSFIELD, J. A. (2011) A zebrafish model of Roberts syndrome reveals that Esco2 depletion interferes with development by disrupting the cell cycle. *PLoS ONE*, 6, e20051.
- MURTHY S., AGOULNIK I.U., WEIGEL N.L.(2005)Androgen receptor signaling and vitamin D receptor action in prostate cancer cells. *Prostate*. 64,362-72.
- MUSACCHIO, A. & SALMON, E. D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 379-93.
- MUSIO, A., MARIANI, T., MONTAGNA, C., ZAMBRONI, D., ASCOLI, C., RIED, T. & VEZZONI, P. (2004) Recapitulation of the Roberts syndrome cellular phenotype by inhibition of INCENP, ZWINT-1 and ZW10 genes. *Gene*, 331, 33-40.
- MUSIO, A., SELICORNI, A., FOCARELLI, M. L., GERVASINI, C., MILANI, D., RUSSO, S., VEZZONI, P. & LARIZZA, L. (2006) X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nat Genet*, 38, 528-30.
- NASMYTH, K. (2011) Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat Cell Biol*, 13, 1170-7.
- NASMYTH, K. & HAERING, C. H. (2009) Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*, 43, 525-58.
- NASMYTH, K., PETERS, J. M. & UHLMANN, F. (2000) Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*, 288, 1379-85.
- NATIVIO, R., WENDT, K. S., ITO, Y., HUDDLESTON, J. E., URIBE-LEWIS, S., WOODFINE, K., KRUEGER, C., REIK, W., PETERS, J. M. & MURRELL, A. (2009) Cohesin is required for

- higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. *PLoS Genet*, 5, e1000739.
- NEUWALD, A. F. & HIRANO, T. (2000) HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res*, 10, 1445-52.
- NEZI L., MUSACCHIO A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*.21(6), 785-795.
- NISHIYAMA, T., LADURNER, R., SCHMITZ, J., KREIDL, E., SCHLEIFFER, A., BHASKARA, V., BANDO, M., SHIRAHIGE, K., HYMAN, A. A., MECHTLER, K. & PETERS, J. M. (2010) Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell*, 143, 737-49.
- NONAKA, N., KITAJIMA, T., YOKOBAYASHI, S., XIAO, G., YAMAMOTO, M., GREWAL, S. I. & WATANABE, Y. (2002) Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, 4, 89-93.
- OLIVEIRA, R. A. & NASMYTH, K. (2010) Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochem Soc Trans*, 38, 1639-44.
- PANIZZA, S., TANAKA, T., HOCHWAGEN, A., EISENHABER, F. & NASMYTH, K. (2000) Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol*, 10, 1557-64.
- PARELHO, V., HADJUR, S., SPIVAKOV, M., LELEU, M., SAUER, S., GREGSON, H. C., JARMUZ, A., CANZONETTA, C., WEBSTER, Z., NESTEROVA, T., COBB, B. S., YOKOMORI, K., DILLON, N., ARAGON, L., FISHER, A. G. & MERKENSCHLAGER, M. (2008) Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell*, 132, 422-33.
- PAULI, A., ALTHOFF, F., OLIVEIRA, R. A., HEIDMANN, S., SCHULDINER, O., LEHNER, C. F., DICKSON, B. J. & NASMYTH, K. (2008) Cell-Type-Specific TEV Protease Cleavage Reveals Cohesin Functions in Drosophila Neurons. *Dev Cell*, 14, 239-51.
- PAULI, A., VAN BEMMEL, J. G., OLIVEIRA, R. A., ITOH, T., SHIRAHIGE, K., VAN STEENSEL, B. & NASMYTH, K. (2010) A direct role for cohesin in gene regulation and ecdysone response in Drosophila salivary glands. *Curr Biol*, 20, 1787-98.
- PERERA, D., TILSTON, V., HOPWOOD, J. A., BARCHI, M., BOOT-HANDFORD, R. P. & TAYLOR, S. S. (2007) Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint. *Dev Cell*, 13, 566-79.
- PEREZ DE CASTRO, I., DE CARCER, G. & MALUMBRES, M. (2007) A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis*, 28, 899-912.

- POTTS, P. R., PORTEUS, M. H. & YU, H. (2006) Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *Embo J*, 25, 3377-88.
- PRIETO, I., SUJA, J. A., PEZZI, N., KREMER, L., MARTINEZ, A. C., RUFAS, J. S. & BARBERO, J. L. (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol*, 3, 761-6.
- RAJAGOPALAN, H. & LENGAUER, C. (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432, 338-41.
- RANKIN, S. (2005) Sororin, the cell cycle and sister chromatid cohesion. *Cell Cycle*, 4, 1039-42.
- REMESEIRO, S., CUADRADO, A., CARRETERO, M., MARTÍNEZ, P., DROSOPOULOS, W. C., CAÑAMERO, M., SCHILDKRAUT, C. L., BLASCO, M. A. & LOSADA, A. (2012a) Cohesin-SA1 deficiency drives aneuploidy and tumourigenesis in mice due to impaired replication of telomeres. *Embo J*, 31, 2076-89.
- REMESEIRO, S., CUADRADO, A., GÓMEZ-LÓPEZ, G., PISANO, D. G. & LOSADA, A. (2012b) A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development. *EMBO J*, 31, 2090-102.
- RESNICK, T. D., SATINOVER, D. L., MACISAAC, F., STUKENBERG, P. T., EARNSHAW, W. C., ORR-WEAVER, T. L. & CARMENA, M. (2006) INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the Shugoshin MEI-S332 in Drosophila. *Dev Cell*, 11, 57-68.
- REVENKOVA, E., EIJPE, M., HEYTING, C., HODGES, C. A., HUNT, P. A., LIEBE, B., SCHERTHAN, H. & JESSBERGER, R. (2004) Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol*, 6, 555-62.
- RIEDEL, C. G., KATIS, V. L., KATOU, Y., MORI, S., ITOH, T., HELMHART, W., GALOVA, M., PETRONCZKI, M., GREGAN, J., CETIN, B., MUDRAK, I., OGRIS, E., MECHTLER, K., PELLETIER, L., BUCHHOLZ, F., SHIRAHIGE, K. & NASMYTH, K. (2006) Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature*, 441, 53-61.
- RIVERA, T., GHENIOU, C., RODRIGUEZ-CORSINO, M., MOCHIDA, S., FUNABIKI, H. & LOSADA, A. (2012) Xenopus Shugoshin 2 regulates the spindle assembly pathway mediated by the chromosomal passenger complex. *Embo J*.
- RIVERA, T. & LOSADA, A. (2009) Shugoshin regulates cohesion by driving relocalization of PP2A in Xenopus extracts. *Chromosoma*, 118, 223-33.
- ROLEF BEN-SHAHAR, T., HEEGER, S., LEHANE, C., EAST, P., FLYNN, H., SKEHEL, M. & UHLMANN, F. (2008) Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science*, 321, 563-6.

- ROLLINS, R. A., KOROM, M., AULNER, N., MARTENS, A. & DORSETT, D. (2004) Drosophila nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scc3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol Cell Biol*, 24, 3100-11.
- ROLLINS, R. A., MORCILLO, P. & DORSETT, D. (1999) Nipped-B, a Drosophila homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics*, 152, 577-93.
- ROWLAND, B. D., ROIG, M. B., NISHINO, T., KURZE, A., ULUOCAK, P., MISHRA, A., BECKOUE, F., UNDERWOOD, P., METSON, J., IMRE, R., MECHTLER, K., KATIS, V. L. & NASMYTH, K. (2009) Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell*, 33, 763-74.
- RUBIO, E. D., REISS, D. J., WELCSH, P. L., DISTECHE, C. M., FILIPPOVA, G. N., BALIGA, N. S., AEBERSOLD, R., RANISH, J. A. & KRUMM, A. (2008) CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8309-14.
- RUCHAUD, S., CARMENA, M. & EARNSHAW, W. C. (2007) Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 798-812.
- SALIC, A., WATERS, J. C. & MITCHISON, T. J. (2004) Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell*, 118, 567-78.
- SANTAGUIDA, S. & MUSACCHIO, A. (2009) The life and miracles of kinetochores. *Embo J*, 28, 2511-31.
- SANTAGUIDA, S., VERNIERI, C., VILLA, F., CILIBERTO, A. & MUSACCHIO, A. (2011) Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *Embo J*, 30, 1508-19.
- SCHAAF, C. A., MISULOVIN, Z., SAHOTA, G., SIDDIQUI, A. M., SCHWARTZ, Y. B., KAHN, T. G., PIRROTTA, V., GAUSE, M. & DORSETT, D. (2009) Regulation of the Drosophila Enhancer of split and invected-engrailed gene complexes by sister chromatid cohesion proteins. *PLoS ONE*, 4, e6202.
- SCHAR, P., FASI, M. & JESSBERGER, R. (2004) SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res*, 32, 3921-9.
- SCHMIDT, D., SCHWALIE, P. C., ROSS-INNES, C. S., HURTADO, A., BROWN, G. D., CARROLL, J. S., FLICEK, P. & ODOM, D. T. (2010) A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res*, 20, 578-88.

- SCHMITZ, J., WATRIN, E., LENART, P., MECHTLER, K. & PETERS, J. M. (2007) Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr Biol*, 17, 630-6.
- SEITAN, V. C., BANKS, P., LAVAL, S., MAJID, N. A., DORSETT, D., RANA, A., SMITH, J., BATEMAN, A., KRPIC, S., HOSTERT, A., ROLLINS, R. A., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., BENARD, C. Y., HEKIMI, S., NEWBURY, S. F. & STRACHAN, T. (2006) Metazoan Scc4 Homologs Link Sister Chromatid Cohesion to Cell and Axon Migration Guidance. *PLoS Biol*, 4.
- SEITAN, V. C., HAO, B., TACHIBANA-KONWALSKI, K., LAVAGNOLLI, T., MIRA-BONTENBAL, H., BROWN, K. E., TENG, G., CARROLL, T., TERRY, A., HORAN, K., MARKS, H., ADAMS, D. J., SCHATZ, D. G., ARAGON, L., FISHER, A. G., KRANGEL, M. S., NASMYTH, K. & MERKENSCHLAGER, M. (2011) A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature*, 476, 467-71.
- SERRANO, A., RODRIGUEZ-CORSINO, M. & LOSADA, A. (2009) Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesin enrichment in human cells. *PLoS ONE*, 4, e5118.
- SHAMU, C. E. & MURRAY, A. W. (1992) Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol*, 117, 921-34.
- SHINTOMI, K. & HIRANO, T. (2009) Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev*, 23, 2224-36.
- SHINTOMI, K. & HIRANO, T. (2010) Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma*, 119, 459-67.
- SHINTOMI, K. & HIRANO, T. (2011) The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev*, 25, 1464-9.
- SJOGREN, C. & NASMYTH, K. (2001) Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol*, 11, 991-5.
- SKIBBENS, R. V., CORSON, L. B., KOSHLAND, D. & HIETER, P. (1999) Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev*, 13, 307-19.
- SOLOMON, D. A., KIM, T., DIAZ-MARTINEZ, L. A., FAIR, J., ELKAHLOUN, A. G., HARRIS, B. T., TORETSKY, J. A., ROSENBERG, S. A., SHUKLA, N., LADANYI, M., SAMUELS, Y., JAMES, C. D., YU, H., KIM, J. S. & WALDMAN, T. (2011) Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science*, 333, 1039-43.

- SONG, J., LAFONT, A., CHEN, J., WU, F. M., SHIRAHIGE, K. & RANKIN, S. (2012) Cohesin Acetylation Promotes Sister Chromatid Cohesion Only in Association with the Replication Machinery. *J Biol Chem*.
- SONODA, E., MATSUSAKA, T., MORRISON, C., VAGNARELLI, P., HOSHI, O., USHIKI, T., NOJIMA, K., FUKAGAWA, T., WAIZENEGGER, I. C., PETERS, J. M., EARNSHAW, W. C. & TAKEDA, S. (2001) Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell*, 1, 759-70.
- STEAD, K., AGUILAR, C., HARTMAN, T., DREXEL, M., MELUH, P. & GUACCI, V. (2003) Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol*, 163, 729-41.
- STEIGEMANN, P. & GERLICH, D. W. (2009) Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends Cell Biol*, 19, 606-16.
- STROM, L., KARLSSON, C., LINDROOS, H. B., WEDAHL, S., KATOU, Y., SHIRAHIGE, K. & SJOGREN, C. (2007) Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science*, 317, 242-5.
- SUMARA, I., VORLAUFER, E., GIEFFERS, C., PETERS, B. H. & PETERS, J. M. (2000) Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*, 151, 749-62.
- SUMARA, I., VORLAUFER, E., STUKENBERG, P. T., KELM, O., REDEMANN, N., NIGG, E. A. & PETERS, J. M. (2002) The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell*, 9, 515-25.
- SUN, Y., KUCEJ, M., FAN, H. Y., YU, H., SUN, Q. Y. & ZOU, H. (2009) Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. *Cell*, 137, 123-32.
- SUNDIN, O. & VARSHAVSKY, A. (1980) Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell*, 21, 103-14.
- SUTANI, T., KAWAGUCHI, T., KANNO, R., ITOH, T. & SHIRAHIGE, K. (2009) Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol*, 19, 492-7.
- TAKAHASHI, T. S., BASU, A., BERMUDEZ, V., HURWITZ, J. & WALTER, J. C. (2008) Cdc7-Drf1 kinase links chromosome cohesion to the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, 22, 1894-905.
- TANAKA, K., HAO, Z., KAI, M. & OKAYAMA, H. (2001) Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *Embo J*, 20, 5779-90.

- TANAKA, K., YONEKAWA, T., KAWASAKI, Y., KAI, M., FURUYA, K., IWASAKI, M., MURAKAMI, H., YANAGIDA, M. & OKAYAMA, H. (2000) Fission yeast Eso1p is required for establishing sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell Biol*, 20, 3459-69.
- TANENBAUM, M. E. & MEDEMA, R. H. (2010) Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev Cell*, 19, 797-806.
- TANG, Z., SHU, H., QI, W., MAHMOOD, N. A., MUMBY, M. C. & YU, H. (2006) PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell*, 10, 575-85.
- TEDESCHI, A. (2010) Roles of Wapl in cell cycle progression and chromosome segregation. *Molecular Biology*. Vienna, University of Vienna.
- TERRET, M. E., SHERWOOD, R., RAHMAN, S., QIN, J. & JALLEPALLI, P. V. (2009) Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature*, 462, 231-4.
- TONKIN, E. T., WANG, T. J., LISGO, S., BAMSHAD, M. J. & STRACHAN, T. (2004) NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet*, 36, 636-41.
- TOTH, A., CIOSK, R., UHLMANN, F., GALOVA, M., SCHLEIFFER, A. & NASMYTH, K. (1999) Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev*, 13, 320-33.
- TOYODA, Y. & YANAGIDA, M. (2006) Coordinated requirements of human topo II and cohesin for metaphase centromere alignment under Mad2-dependent spindle checkpoint surveillance. *Mol Biol Cell*, 17, 2287-302.
- TSUKAHARA, T., TANNO, Y. & WATANABE, Y. (2010) Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*.
- UHLMANN, F., LOTSPEICH, F. & NASMYTH, K. (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, 400, 37-42.
- UHLMANN, F. & NASMYTH, K. (1998) Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol*, 8, 1095-101.
- UNAL, E., HEIDINGER-PAULI, J. M., KIM, W., GUACCI, V., ONN, I., GYGI, S. P. & KOSHLAND, D. E. (2008) A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science*, 321, 566-9.
- UNAL, E., HEIDINGER-PAULI, J. M. & KOSHLAND, D. (2007) DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science*, 317, 245-8.
- VAN HEEMST, D., JAMES, F., POGGELER, S., BERTEAUX-LECELLIER, V. & ZICKLER, D. (1999) Spo76p is a conserved chromosome morphogenesis protein that links the mitotic and meiotic programs. *Cell*, 98, 261-71.

- VAN HEEMST, D., KAHER, E., JOHN, T., HEYTING, C., VAN AALDEREN, M. & ZICKLER, D. (2001) BimD/SPO76 is at the interface of cell cycle progression, chromosome morphogenesis, and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6267-72.
- VAUR, S., FEYTOUT, A., VAZQUEZ, S. & JAVERTZAT, J. P. (2012) Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO Rep*, 13, 645-52.
- VEGA, H., TRAINER, A. H., GORDILLO, M., CROSIER, M., KAYSERILI, H., SKOVBY, F., UZIELLI, M. L., SCHNUR, R. E., MANOUVRIER, S., BLAIR, E., HURST, J. A., FORZANO, F., MEINS, M., SIMOLA, K. O., RAAS-ROTHSCHILD, A., HENNEKAM, R. C. & JABS, E. W. (2010) Phenotypic variability in 49 cases of ESCO2 mutations, including novel missense and codon deletion in the acetyltransferase domain, correlates with ESCO2 expression and establishes the clinical criteria for Roberts syndrome. *J Med Genet*, 47, 30-7.
- VEGA, H., WAISFISZ, Q., GORDILLO, M., SAKAI, N., YANAGIHARA, I., YAMADA, M., VAN GOSLIGA, D., KAYSERILI, H., XU, C., OZONO, K., JABS, E. W., INUI, K. & JOENJE, H. (2005) Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet*, 37, 468-70.
- WAIZENEGGER, I. C., HAUF, S., MEINKE, A. & PETERS, J. M. (2000) Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, 103, 399-410.
- WANG, F., DAI, J., DAUM, J. R., NIEDZIALKOWSKA, E., BANERJEE, B., STUKENBERG, P. T., GORBSKY, G. J. & HIGGINS, J. M. (2010) Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science*, 330, 231-5.
- WANG, F., YODER, J., ANTOSHECHKIN, I. & HAN, M. (2003) *Caenorhabditis elegans* EVL-14/PDS-5 and SCC-3 are essential for sister chromatid cohesion in meiosis and mitosis. *Mol Cell Biol*, 23, 7698-707.
- WANG, S. W., READ, R. L. & NORBURY, C. J. (2002) Fission yeast Pds5 is required for accurate chromosome segregation and for survival after DNA damage or metaphase arrest. *J Cell Sci*, 115, 587-98.
- WATRIN, E., SCHLEIFFER, A., TANAKA, K., EISENHABER, F., NASMYTH, K. & PETERS, J. M. (2006) Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr Biol*, 16, 863-74.
- WEAVER, B. A. & CLEVELAND, D. W. (2006) Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol*, 18, 658-67.
- WEAVER, B. A., SILK, A. D., MONTAGNA, C., VERDIER-PINARD, P. & CLEVELAND, D. W. (2007) Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell*, 11, 25-36.

- WEITZER, S., LEHANE, C. & UHLMANN, F. (2003) A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr Biol*, 13, 1930-40.
- WENDT, K. S., YOSHIDA, K., ITOH, T., BANDO, M., KOCH, B., SCHIRGHUBER, E., TSUTSUMI, S., NAGAE, G., ISHIHARA, K., MISHIRO, T., YAHATA, K., IMAMOTO, F., ABURATANI, H., NAKAO, M., IMAMOTO, N., MAESHIMA, K., SHIRAHIGE, K. & PETERS, J. M. (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, 451, 796-801.
- WHELAN, G., KREIDL, E., PETERS, J. M. & EICHELE, G. (2012) The non-redundant function of cohesin acetyltransferase Esco2: Some answers and new questions. *Nucleus*, 3.
- WHELAN, G., KREIDL, E., WUTZ, G., EGNER, A., PETERS, J. M. & EICHELE, G. (2011) Cohesin acetyltransferase Esco2 is a cell viability factor and is required for cohesion in pericentric heterochromatin. *Embo J*, 31, 71-82.
- WILLIAMS, B. C., GARRETT-ENGELE, C. M., LI, Z., WILLIAMS, E. V., ROSENMAN, E. D. & GOLDBERG, M. L. (2003) Two putative acetyltransferases, san and deco, are required for establishing sister chromatid cohesion in Drosophila. *Curr Biol*, 13, 2025-36.
- WILLIAMS B.R., PRABHU V.R., HUNTER K.E., GLAZIER C.M., WHITTAKER C.A., HOUSMAN D.E., AMON A. (2008). Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science*, 322, 703-709.
- WILLIAMS, B. R. & AMON, A. (2009) Aneuploidy: cancer's fatal flaw? *Cancer Res*, 69, 5289-91.
- WILLIAMS, B. R., PRABHU, V. R., HUNTER, K. E., GLAZIER, C. M., WHITTAKER, C. A., HOUSMAN, D. E. & AMON, A. (2008) Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science*, 322, 703-9.
- XU, H., TOMASZEWSKI, J. M. & MCKAY, M. J. (2011) Can corruption of chromosome cohesion create a conduit to cancer? *Nat Rev Cancer*, 11, 199-210.
- YAMAGISHI, Y., HONDA, T., TANNO, Y. & WATANABE, Y. (2010) Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science*, 330, 239-43.
- YAZDI, P. T., WANG, Y., ZHAO, S., PATEL, N., LEE, E. Y. & QIN, J. (2002) SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev*, 16, 571-82.
- ZHANG, B., CHANG, J., FU, M., HUANG, J., KASHYAP, R., SALAVAGGIONE, E., JAIN, S., KULKARNI, S., DEARDORFF, M. A., UZIELLI, M. L., DORSETT, D., BEEBE, D. C., JAY, P. Y., HEUCKEROOTH, R. O., KRANTZ, I. & MILBRANDT, J. (2009) Dosage effects of cohesin regulatory factor PDS5 on mammalian development: implications for cohesinopathies. *PLoS ONE*, 4, e5232.

- ZHANG, B., JAIN, S., SONG, H., FU, M., HEUCKEROTH, R. O., ERLICH, J. M., JAY, P. Y. & MILBRANDT, J. (2007) Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome. *Development*, 134, 3191-201.
- ZHANG, J., SHI, X., LI, Y., KIM, B. J., JIA, J., HUANG, Z., YANG, T., FU, X., JUNG, S. Y., WANG, Y., ZHANG, P., KIM, S. T., PAN, X. & QIN, J. (2008a) Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol Cell*, 31, 143-51.
- ZHANG, N., KUZNETSOV, S. G., SHARAN, S. K., LI, K., RAO, P. H. & PATI, D. (2008b) A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol*, 183, 1019-31.

ANEXO

